

## École Doctorale ABIES

Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé

### THESE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Université Paris-Est**

**Spécialité : Sciences de la vie et de la santé**

*présentée et soutenue publiquement par*

**Mathilde GONDARD**

le jeudi 7 décembre 2017

**A la découverte des agents pathogènes et microorganismes**

**des tiques de la Caraïbe par**

**séquençage de nouvelle génération et PCR microfluidique en temps réel**

Directrice de thèse : **Sara Moutailler**<sup>1</sup>

Co-directeur de la thèse : **Emmanuel Albina**<sup>2</sup>

Co-directeur de la thèse : **Muriel Vayssier-Taussat**<sup>1</sup>

**Co-financement ANSES/CIRAD**

### Jury de thèse

**M. Olivier DURON**, Chargé de recherche, CNRS

**M. Pierre-Edouard FOURNIER**, Professeur, Aix-Marseille Université, IHU - Méditerranée Infection

**Mme Laurence VIAL**, Chargée de recherche, CIRAD

**Mme Sylvie LECOLLINET**, Directeur de recherche, ANSES

**M. Olivier PLANTARD**, Directeur de recherche, INRA

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

<sup>1</sup> UMR BIPAR, ANSES, INRA, ENVA, Université Paris-Est - Laboratoire de Santé Animale, Equipe VectotiQ

ANSES, 14 Rue Pierre et Marie Curie, 94700 Maisons-Alfort

<sup>2</sup> UMR ASTRE CIRAD-INRA – Centre de recherche et de veille Caraïbes

Domaine Duclos, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe

*Je dédie ce manuscrit à la tribu des Gondard-Garsault,  
à leur soutien inconditionnel*

## REMERCIEMENTS

Partie d'apparence la plus simple à rédiger, mais qui est pour moi une des plus compliquée ! En effet, entre Maisons-Alfort et la Guadeloupe j'ai énormément de monde à remercier depuis mon début de thèse et j'espère n'avoir oublié personne !!

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury de thèse qui ont bien voulu prendre de leur temps pour juger mon travail : Olivier Duron, Pierre-Edouard Fournier, Laurence Vial, Sylvie Lecollinet, et Olivier Plantard.

Ensuite, mes remerciements vont à mes directeurs de thèse, Muriel, Emmanuel et Sara. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet aussi passionnant, merci d'avoir été aussi généreux et de m'avoir fait autant voyager. Avec la Roumanie, la Guadeloupe, l'Espagne, l'Australie et pour finir la Crète, j'ai la tête pleine de souvenirs et d'aventures qui resteront gravées ! Muriel et Emmanuel, merci également pour votre encadrement, et surtout de votre disponibilité malgré les décalages horaires et les plannings surchargés. Enfin, Sara, en plus de ton encadrement, un grand merci pour ton soutien, pour m'avoir fait confiance et pour avoir été là en toute circonstance.

Je continuerai mes remerciements avec mes collègues et amis rencontrés au cours de mes traversées transatlantiques entre Maisons-Alfort et la Guadeloupe.

Je tiens à remercier les membres de l'UMR BIPAR pour leur accueil et leur sympathie. Tout particulièrement, un immense merci à la famille du bâtiment Carré : Elodie, Matthieu, Martine, Evelyne, Françoise, Sarah, Thomas, Emilie, Sandy, Tamara, et toute la smala, merci pour les fous rires, les mots croisés, les confidences, le soutien, les apéros, les gâteaux ..... Bref, il y a de la vie dans cette chaumière et j'ai été très chanceuse d'en faire partie ! Je tiens également à remercier les membres du CRVC de Guadeloupe, pour leur accueil et leur amitié, Nathalie, Christophe, Damien (vraiment merci, la piscine m'a sauvé la vie ☺), Yolaine, Anne ... et enfin Rosalie, merci pour toute ton aide ! Je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite !!

Enfin, un immense merci à mes ptits bouchons, mes aventurières du dimanche, Coline, Laura, Océ, et Johanna, que de chance de vous avoir rencontré, grâce à vous j'ai non seulement relevé le défi de survivre en milieu tropical (dur dur la chaleur), mais j'y ai même pris goût!! Vivement nos retrouvailles, et à la lézarde si possible!

Un grand merci à mes amis Palois, bien sûr, on se connaît depuis nos 12 ans ou nos vingt ans pour certains, Marion, Nunga, Auré, Marie, Dodo, loulou, Yannick, Cécile, Maud, la Poulopote, etc... je suis particulièrement chanceuse de vous avoir avec moi, merci de votre soutien malgré la distance et les années qui passent !

Finalement, comme on dit les meilleurs pour la fin... je tiens à remercier ceux sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, mon clan, ma petite tribu, les Gondardini ;) : Dani, Manou, Doudou, Maïté, Papa, Maman, le frerot et la sœurte! A ceux qui sont toujours là, et à ceux qui restent gravés dans ma mémoire, tout simplement merci d'être vous, merci d'y croire quoi qu'il arrive, d'être toujours là pour moi et de me soutenir coûte que coûte.



*Je remercie l'ANSES et le CIRAD qui ont  
cofinancé mon projet de Thèse.*

*Ce travail a été soutenu partiellement par la  
Région Guadeloupe et l'Union Européenne, dans  
le cadre du projet « MALIN » (Maladies  
infectieuses, 2015-FED-86, 2014-2017), ainsi que  
par le projet « Patho-ID » du métaprogramme  
Métabolisme et écosystèmes microbiens de  
l'INRA.*

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
1. Les tiques	7
1.1. Taxonomie des tiques	7
1.2. Bio-écologie des tiques	10
1.2.1. Anatomie externe générale des tiques	10
1.2.1.1. Le capitulum	10
1.2.1.2. L'idiosome	12
1.2.2. Anatomie interne générale des tiques et aspect physiologique	13
1.2.2.1. Système digestif	13
1.2.2.2. Les glandes salivaires	14
1.2.2.3. Les tubes de malpighi	15
1.2.2.4. Glandes coxales des argasidae	16
1.2.2.5. Le système respiratoire	16
1.2.2.6. Le système circulatoire	16
1.2.2.7. Le système nerveux	17
1.2.2.8. Le système reproducteur	17
1.2.3. Cycle de vie et écologie des tiques	17
1.2.3.1. Le cycle de développement	17
1.2.3.2. Les différents cycles de vie des tiques	20
1.2.3.3. Ecologie des tiques et préférences trophiques	22
1.3. Importance médicale et vétérinaire des tiques	24
1.3.1. Impact direct et indirect des tiques en sante humaine et animale	24
1.3.1.1. Impacts sanitaires directs des tiques	24
1.3.1.2. Impacts sanitaires indirects des tiques	25
1.3.2. Epidemiologie des maladies a tiques	32
1.3.2.1. Acquisition et transmission des agents pathogènes	32
1.3.2.2. Capacité et compétence vectorielle	33
2. Les tiques et les agents pathogènes transmis par les tiques dans la zone des Caraïbes	35
<b>REVUE: Ticks and tick-borne pathogens of the caribbean: current understanding and future directions for more comprehensive surveillance</b>	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
3. Objectifs de la thèse	77

<b>CHAPITRE 1 : Détection par séquençage de nouvelle génération des microorganismes et agents pathogènes présents dans les tiques de Guadeloupe et de Martinique</b>	<b>79</b>
1. Introduction	80
2. Matériel et méthode	81
2.1. Collecte des tiques en Guadeloupe et Martinique	81
2.2. Traitement des échantillons de tiques en vue du séquençage	83
2.2.1. Broyat des échantillons de tiques	83
2.2.2. Extraction des acides nucléiques des échantillons de tiques	83
2.2.3. Traitement à la DNase des acides nucléiques extraits	84
2.3. Séquençage de nouvelle génération (NGS): RNAseq	84
2.3.1. Rétro-transcription des ARNs	84
2.3.2. Séquençage : RNAseq Illumina HIseq2000	84
2.3.3. Traitement des données de séquençage	86
2.3.3.1. Traitement et nettoyage des données brutes	86
2.3.3.2. Attribution taxonomique des contigs	86
2.4. Analyse des génomes viraux détectés en NGS	88
3. Résultats	90
3.1. Description générale des données de séquençage	90
3.2. Inventaire des séquences d'origine bactérienne d'importance médicale et vétérinaire	91
3.2.1. Séquences contigs appartenant au genre <i>Anaplasma</i>	91
3.2.2. Séquences contigs appartenant au genre <i>Ehrlichia</i>	92
3.2.3. Séquences contigs appartenant au genre <i>Rickettsia</i>	93
3.2.4. Séquences contigs appartenant au genre <i>Borrelia</i>	93
3.2.5. Séquences contigs appartenant au genre <i>Coxiella</i>	94
3.3. Inventaire des séquences d'origine parasitaire d'importance médicale et vétérinaire	98
3.4. Inventaire des séquences d'origine virale présentes dans les tiques	100
3.4.1. Séquence contig « Changping tick virus-Like »	100
3.4.2. Séquences contigs « Wuhan tick virus-Like »	101
3.4.3. Séquences contigs « Lihan tick virus-Like »	101
3.4.4. Séquences contigs « Jingmenvirus-Like »	101
3.5. Analyse et reconstruction des génomes viraux	102
3.5.1. Génome du virus “Changping tick virus-Like”	102
3.5.2. Génome du virus “Wuhan tick virus-Like”	104
3.5.3. Génome du virus “Lihan tick virus-Like”	106
3.5.4. Génome du virus “Jingmenvirus-Like”	110
4. Discussion	114

<b>CHAPITRE 2 : Criblage des agents pathogènes et microorganismes dans les tiques des Antilles Françaises par PCR microfluidique en temps-réel a haut débit</b>	119
Introduction du chapitre 2	120
<b>CHAPITRE 2a : Criblage des bactéries et parasites dans les tiques des Antilles Françaises</b>	122
Introduction	123
<b>ARTICLE:</b> Screening of tick-borne pathogens in the french antilles using new high-throughput microfluidic technology	125
<b>CHAPITRE 2b : Criblage des virus dans les tiques des Antilles Françaises</b>	171
Introduction	172
1. Développement de la PCR microfluidique en temps réel à haut débit permettant le criblage des arbovirus dans les tiques	173
2. Adaptation de la PCR microfluidique en temps réel au criblage des arbovirus d'intérêt de la zone Caraïbe	201
2.1. Matériel et méthode	201
2.1.1. Collectes et traitement des échantillons de tiques de Guadeloupe et de Martinique	201
2.1.2. Rétro-transcription des arn, pré-amplification, PCR microfluidique en temps réel	202
2.1.3. Calcul des taux d'infection	202
2.1.4. Sondes et amorces ajoutées	202
2.1.5. Recherche d'éléments viraux endogènes	202
2.2. Résultats	205
2.2.1. Criblage des arbovirus dans les tiques de Guadeloupe et de Martinique	205
2.2.1.1 Le Changping tick virus-Like (ctvl)	205
2.2.1.2 Le Wuhan tick virus-Like (wtvl)	206
2.2.1.3 Le Jjingmenvirus-Like (jvl)	207
2.2.1.4 Le Lihan tick virus-Like (ltvl)	211
2.2.2. Recherche d'éléments viraux endogènes	212
2.3. Discussion	215

<b>CHAPITRE 3 : Collecte de tiques dans les caraïbes et études épidémiologiques exploratoires</b>	220
1. Introduction	221
2. Matériel et méthode :	221
2.1. Organisation de la collecte de tiques en Guadeloupe	221
2.2. Organisation de la collecte de tiques dans les Caraïbes	227
2.3. Réception des échantillons de tiques et identification morphologique	235
2.4. Broyat et extraction des ADN/ARN des tiques	235
3. Résultats de la collecte des tiques en Guadeloupe et dans les Caraïbes	235
3.1. Les tiques collectées en Guadeloupe	235
3.2 Collecte de tiques dans les Caraïbes	238
4. Discussion et perspectives	243
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	245
<b>REFERENCES</b>	264
<b>ANNEXES</b>	274

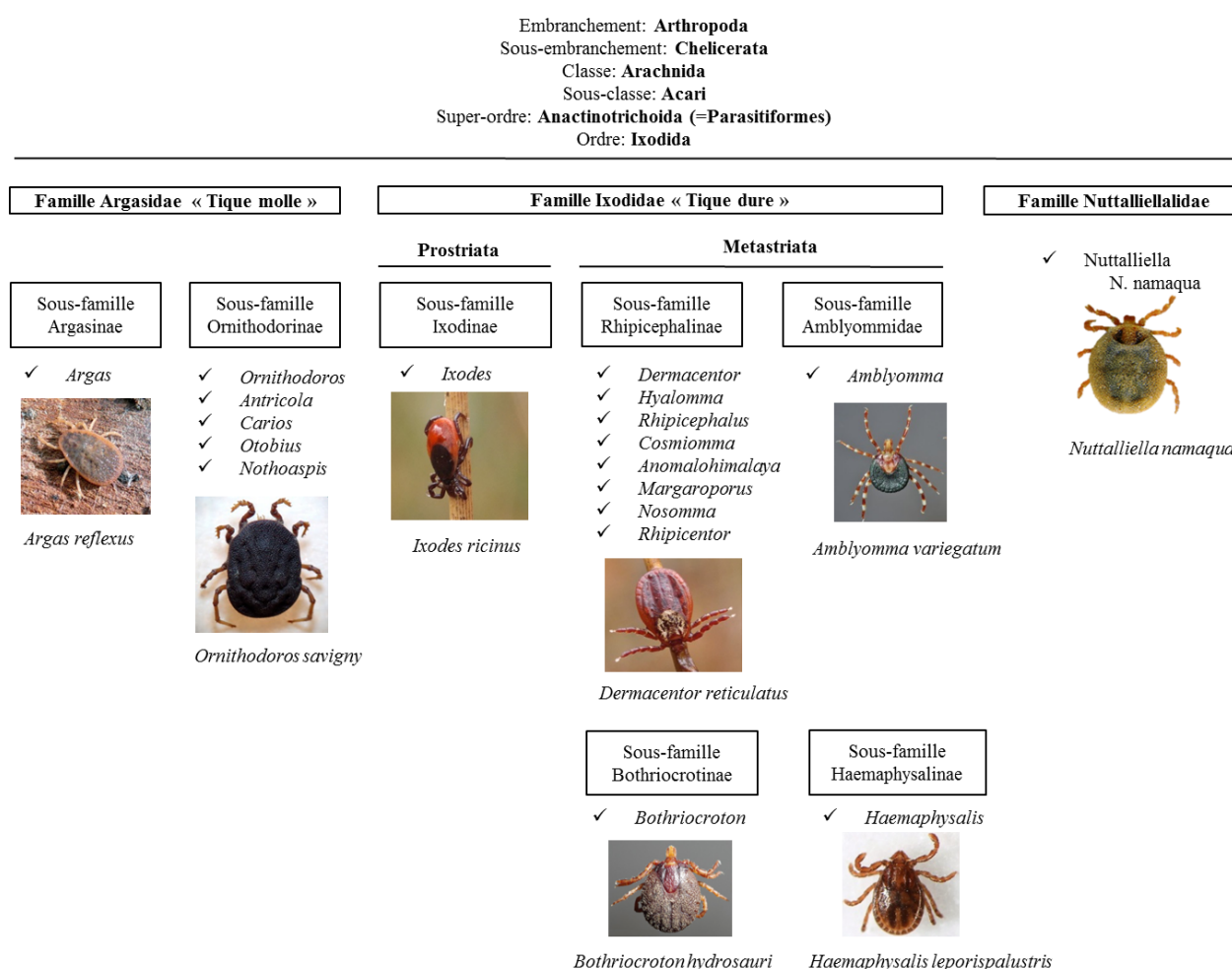
# INTRODUCTION

En préambule de ce chapitre d'introduction, je souhaite informer le lecteur qu'au cours de la thèse, j'ai écrit une revue qui fait un état des lieux des connaissances épidémiologiques concernant les tiques et les agents pathogènes transmis par les tiques rapportés dans les Caraïbes. La revue fut aussi l'occasion de discuter de la nécessité du développement et de l'emploi des technologies de détection à haut débit de microorganismes et agents infectieux dans une perspective d'amélioration des capacités de veille sanitaire liée aux maladies à tique. J'ai placée délibérément la revue en fin du chapitre d'introduction, puisque c'est elle qui me permettra d'introduire plus précisément le contexte de mon étude. Toutefois, j'ai souhaité ajouter des informations plus générales sur la biologie et l'écologie des tiques afin de compléter les données apportées par la revue et d'aider à la compréhension de ce travail.

# 1. Les tiques

## 1.1. Taxonomie des tiques

Les tiques de par la présence d'un exosquelette et d'appendices articulés appartiennent à l'embranchement des arthropodes au sein du règne animal (McCoy and Boulanger, 2015). La classification systématique des tiques est décrite dans la Figure 1. Les tiques sont divisées en trois familles monophylétiques (regroupant l'ensemble des spécimens descendant d'un même ancêtre commun) : la famille des Nuttalliellidae, qui ne comprend qu'une seule espèce, les Ixodidae, encore appelées « tiques dures », qui incluent près de 700 espèces, et enfin les Argasidae, encore appelées « tiques molles » qui sont composées d'environ 200 espèces (Guglielmone *et al.*, 2010).



**Figure 1. Classification systématique des tiques (Ixodida). Classification taxonomique réalisée d'après Boulanger and McCoy, 2017, Guglielmone, 2010; Estrada-Peña *et al.*, 2015.**



La taxonomie des tiques est encore à l'heure actuelle sujette à débat. Les divergences d'opinion concernent principalement l'affiliation des spécimens de tique au niveau du genre et de l'espèce (Estrada-Peña *et al.*, 2010 ; 2015).

Historiquement, la classification systématique des tiques se basait sur la caractérisation morphologique des spécimens ainsi que sur l'étude de leurs caractéristiques biologiques et écologiques et de leur répartition géographique. Ensuite, le développement des techniques de biologie moléculaire a permis d'affiner en partie les données de taxonomie grâce aux études de phylogénie, basées sur l'étude du génome mitochondrial et des gènes des ARNr nucléaires (McCoy and Boulanger, 2015, Burger *et al.*, 2014).

Ainsi, la taxonomie au niveau du genre et des espèces d'Ixodidae a pu être clarifiée et un certain degré de consensus trouvé. Les tiques dures sont réparties au sein de 12 genres (les deux genres fossile *Compluriscutula* et *Cornupalpatum* non compris) : *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Margaropus*, *Nosomma* et les *Rhipicentor* (Guglielmone and Nava, 2014, Estrada-Peña *et al.*, 2015). La classification des tiques molles quant à elle reste encore controversée, le nombre et le nom des genres variant en fonction des opinions. Un des freins majeurs à la mise en place d'un consensus taxonomique est le manque de lignes directrices définissant les termes descriptifs et les traits morphologiques spécifiques des spécimens d'Argasidae, ce qui a engendré une certaine confusion et probablement une sous-estimation de la diversité des tiques molles (Estrada-Peña *et al.*, 2010). La figure 3 présente les quatre écoles de taxonomie qui défendent chacune une vision différente de la systématique des Argasidae (Burger *et al.*, 2014). En résumé, trois genres de tiques molles sont communs aux différentes écoles de taxonomies, les genres *Ornithodoros*, *Argas*, et *Otobius*. Cependant les espèces incluses dans chacun de ces genres ne font pas l'unanimité et varient selon les auteurs, de même que l'existence d'autres genres de tiques molles. Plus précisément, le genre *Carios* décrit par Klompen and Oliver (1993) regrouperait des espèces de tiques classées dans les genres *Antricola* et *Nothoaspis* par d'autres auteurs (Estrada-Peña *et al.*, 2010, Burger *et al.*, 2014). Les figures 1 et 2 incluent les genres de la famille Argasidae décrit par l'école Américaine de taxonomie (Guglielmone *et al.*, 2010 ; Burger *et al.*, 2014).

École Soviétique Filippova (1966) et Pospelova-Shtrom (1969)	École Américaine* Clifford et al. (1964) et Hoogstraal (1985)	École Française Camicas and Morel (1977) et Camicas et al. (1998)	Système cladistique Klompen and Oliver (1993)
<b>Argasinae</b> Argasini <b>Argas</b> <i>Argas</i> <i>Persicargas</i>  <i>Carios</i> <i>Chiropterargas</i>    <i>Secretargas</i>	<b>Argasinae</b>  <b>Argas</b> <i>Argas</i> <i>Persicargas</i>  <i>Carios</i> <i>Chiropterargas</i>    <i>Secretargas</i>    <i>Microargas</i>	<b>Argasinae</b>  <b>Argas</b> <i>Argas</i> <i>Persicargas</i>  <b>Carios</b> <i>Carios</i> <i>Chiropterargas</i>  <b>Ogadenus</b> <i>Ogadenus</i> <i>Secretargas</i> <i>Proknekalia</i>	<b>Argasinae</b>  <b>Argas</b> <i>Argas</i> (incl. <i>Persicargas</i> )    <i>Ogadenus</i> <i>Secretargas</i> <i>Proknekalia</i> <i>Alveonasus</i>
<b>Ornithodorinae</b> Otobiini <b>Otobius</b> <b>Alveonasus</b> <i>Alveonasus</i> <i>Proknekalia</i> <i>Ogadenus</i> Ornithodorini <b>Ornithodoros</b>   <i>Ornithodoros</i> <i>Ornamentum</i>   <i>Pavlovskyella</i> <i>Theriodoros</i>    <i>Alectorobius</i> <i>Reticulinasus</i> <i>Subparmatus</i> <b>Antricola</b> <i>Antricola</i> <i>Parantricola</i>	<b>Ornithodorinae</b>  <b>Otobius</b> <b>Ornithodoros</b> (s.l.) <i>Alveonasus</i> <i>Proknekalia</i>       <i>Ornithodoros</i> <i>Ornamentum</i>    <i>Pavlovskyella</i> (incl. <i>Theriodoros</i> )    <i>Alectorobius</i> <i>Reticulinasus</i> <i>Subparmatus</i> <b>Antricola</b> <i>Antricola</i> <i>Parantricola</i> <b>Nothoaspis</b>	<b>Ornithodorinae</b>  <b>Otobius</b> <b>Alveonasus</b> <i>Alveonasus</i>       <b>Ornithodoros</b> <i>Ornithodoros</i> <i>Ornamentum</i>    <b>Alectorobius</b> <i>Theriodoros</i> (incl. <i>Pavlovskyella</i> )    <i>Alectorobius</i> <i>Reticulinasus</i> <i>Subparmatus</i> <b>Antricola</b>    <b>Parantricola</b> <b>Nothoaspis</b> <b>Microargas</b>	<b>Ornithodorinae</b>  <b>Otobius</b>          <b>Ornithodoros</b> (s.s) (incl. <i>Ornithodoros</i> , <i>Ornamentum</i> , <i>Microargas</i> , <i>Pavlovskyella</i> , <i>Theriodoros</i> )       <b>Carios</b> (s.l.) (incl. <i>Carios</i> , <i>Chiropterargas</i> , <i>Alectorobius</i> , <i>Reticulinasus</i> , <i>Subparmatus</i> , <i>Antricola</i> , <i>Parantricola</i> , <i>Nothoaspis</i> )

Figure 2. Présentation des différentes approches de classification des Argasidae, d'après Burger *et al.*, 2014. En gras, les genres reconnus par chaque école de taxonomie, suivis de leurs sous-genres ; les sous-genres entre parenthèses sont inclus dans les genres et sous-genres cités au dessus mais leur nom ne sont pas validés par les auteurs de l'approche taxonomique associée. (\* : Guglielmone *et al* 2010 a adopté mais pas nécessairement soutenu la vision américaine de la classification des Argasidae).

## **1.2. Bio-écologie des tiques**

Les tiques sont des arthropodes hématophages stricts, se nourrissant uniquement de sang prélevé chez leurs hôtes. Des différences en termes de morphologie, de biologie et d'écologie permettent de bien distinguer les deux principales familles de tiques que sont les Argasidae et les Ixodidae. La dernière famille, Nuttalliellidae, ne comprend qu'une seule espèce de tique décrite en Afrique, présentant des caractéristiques communes aux tiques molles et aux tiques dures. Elle ne sera pas abordée ici. Dans cette étude, je vais seulement présenter une synthèse générale sur les données de morphologie et de biologie des tiques. Si le lecteur souhaite des informations plus approfondies, il peut se reporter aux ouvrages de références anglophones, Sonenshine and Roe, 2014 a et b, et français, Pérez-Eid, 2007, McCoy and Boulanger, 2015 et Boulanger and McCoy, 2017.

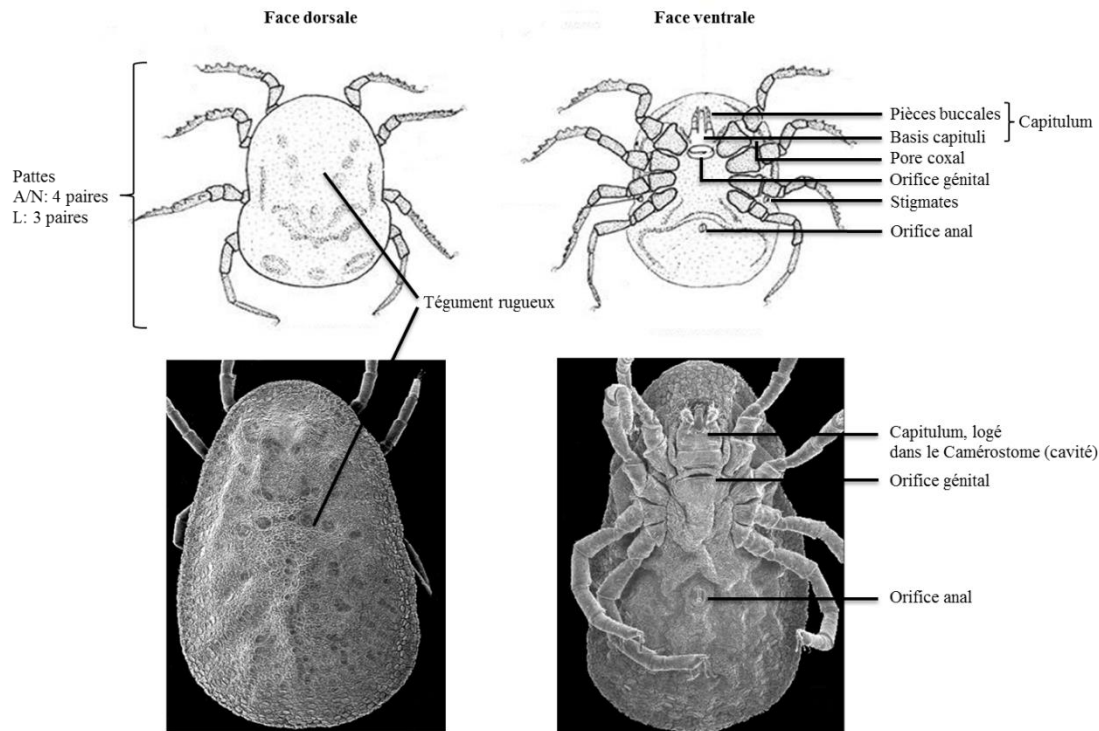
### ***1.2.1. Anatomie externe générale des tiques***

Les tiques présentent un corps divisé en deux parties, le capitulum (ou gnathosome) et l'idiosome.

#### **1.2.1.1. Le Capitulum**

Le capitulum porte les parties buccales, sa position diffère entre les tiques molles et les tiques dures (Figure 3 et 5). Les Ixodidae présente un capitulum en position apicale, visible à la fois en face dorsale et en face ventrale. Les Argasidae ont le capitulum en position ventrale, logé dans une cavité appelée camérostome. Le capitulum est composé de la basis capituli et des parties buccales comprenant la paire de palpes, qui a un rôle sensoriel, et le rostre. Les palpes, composées de quatre articles sont particulièrement mobiles chez les Argasidae contrairement aux Ixodidae (Pérez-Eid, 2007). Le rostre est la partie de la tique qui pénètre la peau de l'hôte, il est constitué des chélicères en position dorsale et de l'hypostome en position ventrale, permettant respectivement à la tique de couper et de s'ancrer dans la peau de l'hôte. Chez les tiques dures la morphologie du capitulum est très utilisée en systématique car il permet d'identifier les différents genres d'Ixodidae (Figure 4) (Pérez-Eid, 2007). Finalement, les femelles Ixodidae présentent des aires poreuses en face dorsale de la basis capituli, qui ont un rôle physiologique lors de l'oviposition (Figure 5) (Pérez-Eid, 2007).





**Figure 5. Anatomie externe des tiques molles, d'après McCoy and Boulanger, 2015, Sonenshine and Roe, 2014a, Pérez-Eid, 2007, Boulanger and McCoy, 2017 (Photographie, Estrada-Peña *et al.*, 2006). A: Adulte ; N: Nymphe ; L: Larve.**

#### 1.2.1.2. L'idiosome

L'idiosome est composé d'un tégument dont la nature diffère entre les Ixodidae et les Argasidae. Chez les tiques molles, le tégument est chitinisé, sans sclérification, souple et rugueux, avec quelques variations d'aspect en fonction des genres décrits (Figure 5) (Pérez-Eid, 2007). Chez les tiques dures, le tégument est composé de parties rigides chitinisées et sclérifiées et de parties souples. La couverture de l'idiosome par ce tégument rigide permet de différencier les mâles des femelles Ixodidae. Chez les mâles le tégument sclérifié, appelé alors conscutum, recouvre la totalité de la surface dorsale. Chez les larves, nymphes et chez la femelle, seule la partie antérieure de l'idiosome dorsal est sclérifiée, et prend le nom de scutum, alors que la partie postérieure est appelé alloscutum (Figure 5) (Pérez-Eid, 2007). En face ventrale des Ixodidae, certaines zones peuvent être sclérifiées, notamment les coxae, mais aussi des parties de tégument appelées plaques, très utiles en classification (Pérez-Eid, 2007).

L'idiosome est constitué d'une partie antérieure appelée podosome, qui porte les paires de pattes et l'orifice génital, et d'une partie postérieure nommée opisthosome qui

présente de nombreuses striations et pores, des organes sensoriels, l'orifice anal, les stigmates, et divers sillons (Sonenshine and Roe, 2014a). Les paires de pattes sont au nombre de quatre chez la nymphe et l'adulte, et au nombre de trois chez les larves. Sur la première paire de pattes se trouve l'organe de Haler en face dorsale du Tarse, qui présente un rôle physiologique significatif, impliqué dans de nombreuses fonctions sensorielles, telles que la localisation d'hôte ou la reconnaissance de phéromones (Sonenshine and Roe, 2014a). La présence, le nombre et la position des organes sensoriels varient selon la famille et le genre de tique, on retrouve par exemple des yeux, des soies tactiles, des pores, des sensilles, etc. Les stigmates en position ventro-latérale sont impliqués dans la respiration des nymphes et adultes. Finalement, on peut noter que chez les tiques dures, la présence et l'orientation du sillon anal permet de distinguer les prostriata des méastriata. Le sillon anal est en forme d'arche et contourne l'anus par l'avant chez les prostriata, et est en forme de U, avec un contournement de l'anus par l'arrière chez les méastriata (sauf chez les tiques *Boophilus* où le sillon est absent) (Pérez-Eid, 2007). Chez les Argasidae, la distinction entre les mâles et les femelles est moins évidente et est liée à la forme du pore génital (Figure 5) (McCoy and Boulanger, 2015). Finalement, les Argasidae portent des pores coxaux situés entre la coxae I et II qui sont impliqués dans les mécanismes d'évacuation d'eau (Sonenshine and Roe, 2014a).

### ***1.2.2. Anatomie interne générale des tiques et aspect physiologique***

L'anatomie interne des tiques est très similaire entre les tiques molles et les tiques dures (McCoy and Boulanger, 2015) (Figure 6).

#### **1.2.2.1. Système digestif**

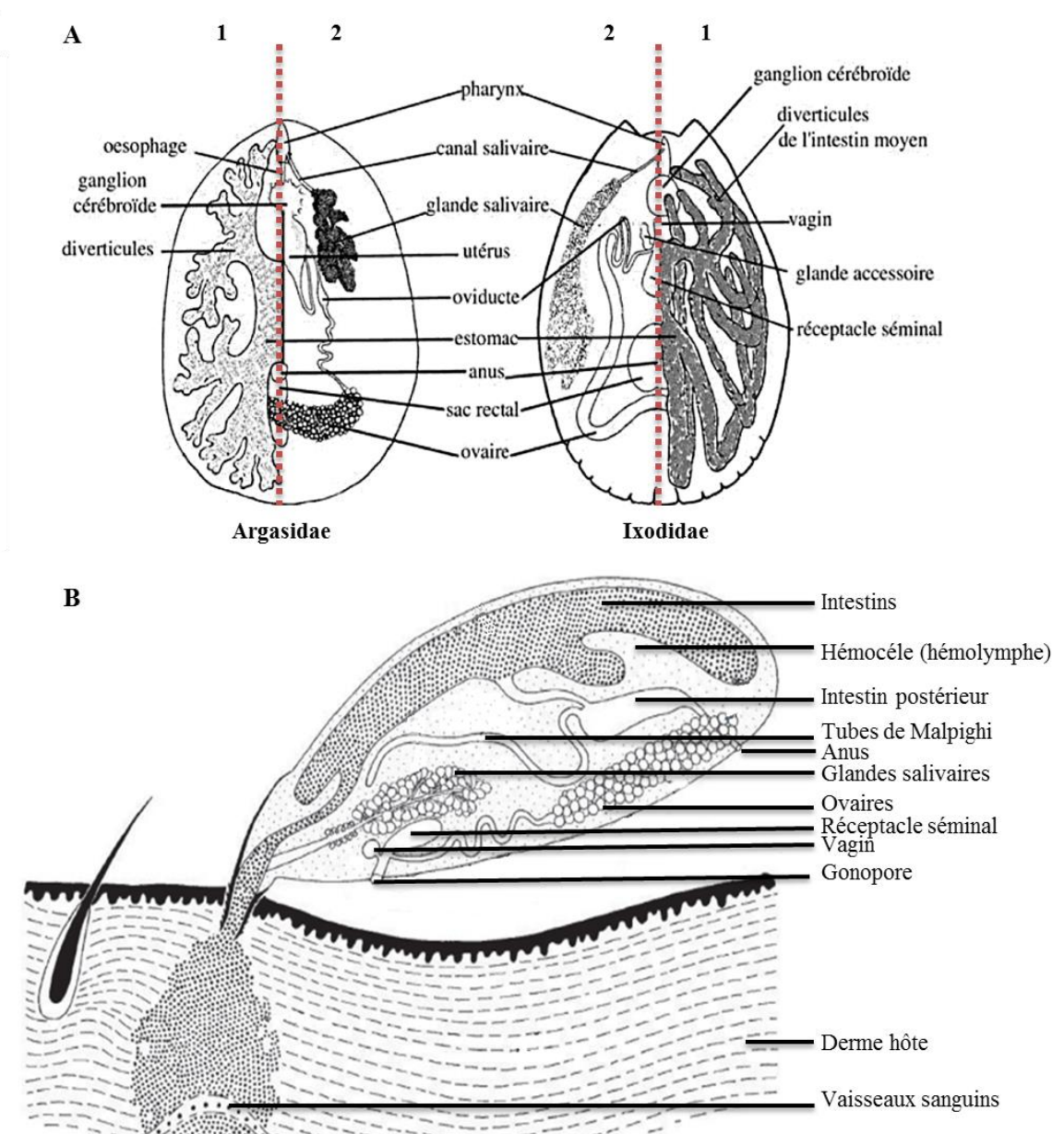
Les tiques sont des arthropodes hématophages stricts, se nourrissant uniquement du sang de leur hôte. En règle générale, chaque stase de la tique réalise un repas sanguin, en dehors de certaines espèces de tique où soit les mâles soit les larves ne se nourrissent pas (McCoy and Boulanger, 2015). L'appareil digestif débute le canal préoral situé au niveau du rostre, qui débouche sur le pharynx, suivi de l'œsophage et de l'intestin moyen. A noter que la prise du repas sanguin et l'excrétion de la salive empruntent le même trajet depuis et vers le rostre via le canal pré-oral, et fonctionnent en alternance (Sonenshine and Roe, 2014a). L'intestin moyen est l'organe le plus volumineux, il est composé d'une portion centrale, appelée

estomac central, à partir duquel se déploient plusieurs diverticules (ou ceacae) (Figure 6). La digestion du sang se réalise au niveau des cellules épithéliales des diverticules de l'intestin moyen. La digestion est intracellulaire, et comprend la dégradation de l'hémoglobine et des protéines de l'hôte, la destruction des fragments cellulaires et la récupération de l'eau qui sera rejetée. L'intestin moyen est aussi un lieu de stockage, la dégradation du repas sanguin pouvant s'étaler sur plusieurs années (Sonenshine and Roe, 2014a). L'estomac central débouche ensuite sur l'intestin postérieur, encore appelé sac rectal qui permet l'évacuation des déchets vers l'anus. L'eau produite au cours de la digestion du repas sanguin va quant à elle être excrétée via les glandes salivaires chez les tiques dures, et via les glandes coxales débouchant sur les pores coxaux chez les tiques molles (Figure 5) (McCoy and Boulanger, 2015).

#### **1.2.2.2. Les glandes salivaires**

Les tiques possèdent deux glandes salivaires. Chacune de ces glandes est constituée d'acini, reliés entre eux par des canules, et l'ensemble forme une structure en grappe. La salive excrétée par les glandes salivaires rejoint les canaux salivaires qui débouchent sur le canal pré-oral (Sonenshine and Roe, 2014a). La taille des glandes salivaires varie selon le cycle de développement de la tique et la prise de repas sanguin. Au cours du repas sanguin, leur taille augmente, alors qu'en fin de repas, les glandes salivaires dégénèrent. Il existe quatre types d'acini, définis selon la présence et la composition de leurs granules de sécrétion (Sonenshine and Roe, 2014a). Les glandes salivaires sont multifonctionnelles, et ont un rôle essentiel dans les mécanismes de parasitisme des tiques et de survie environnementale. Elles sont impliquées dans la sécrétion de multiples composés dans la salive, qui facilitent entre autre la prise du repas sanguin, qui modulent la réaction immunologique de l'hôte et qui assistent la transmission des agents pathogènes. Chez les Ixodidae, elles sont également impliquées dans la synthèse du ciment qui permet une fixation forte sur l'hôte, ou encore dans l'évacuation d'eau provenant du repas sanguin. Les glandes salivaires permettent aussi la régulation de l'hygrométrie de la tique, en lui permettant de survivre dans des environnements à faible taux d'humidité (McCoy and Boulanger, 2015). Finalement, les glandes salivaires et la salive jouent un rôle clé dans la transmission des agents pathogènes aux hôtes vertébrés. En effet, la salive des tiques est non seulement un moyen de transport et d'inoculation des agents pathogènes, mais ses composants vont également faciliter leur transmission en modifiant les conditions environnementale locale au niveau du site de piqûre (Šimo et al., 2017).





**Figure 6.** Anatomie interne générale des tiques, cas d'une femelle adulte, d'après Boulanger and McCoy, 2017, et Pérez-Eid, 2007. **A :** vue supérieure ; **B :** vue inférieure. **A.** Schéma de l'anatomie interne en coupe frontale, 1: Vue de l'anatomie interne qui présente l'estomac, qui recouvre la majorité des organes internes, 2: Vue de l'anatomie interne lorsque l'estomac est retiré. **B.** Schéma de l'anatomie interne en coupe sagittale.

### 1.2.2.3. Les tubes de Malpighi



Les tubes de Malpighi ont une fonction excrétoire, ils collectent les produits nitrogénés présents dans l'hémolymphe et issus du métabolisme des différents organes. Les déchets sont transformés en cristaux de guanine puis acheminés vers le sac rectal, et enfin excrétés par l'anus (McCoy and Boulanger, 2015).

#### **1.2.2.4. Glandes coxales des Argasidae**

Les glandes coxales des Argasidae sont impliquées dans l'évacuation de l'eau accumulée au cours du repas sanguin. Elles débouchent sur les pores coxaux situés entre les coxae I et II des tiques molles. Chez les Ixodidae, cette fonction excrétoire est réalisée par les glandes salivaires (McCoy and Boulanger, 2015).

#### **1.2.2.5. Le système respiratoire**

Un système respiratoire est présent chez la nymphe et l'adulte et est constitué d'un réseau trachéolaire ramifié, formant de multiples arborescences au contact des organes qui débouchent sur les trachées puis les troncs trachéolaires droit et gauche qui mènent enfin aux stigmates, permettant ainsi les échanges gazeux (Figure 6). La larve n'est pas équipée de ce système respiratoire, la respiration est transcutanée, elle se fait à travers la cuticule (McCoy and Boulanger, 2015).

#### **1.2.2.6. Le système circulatoire**

Les tiques ont un système circulatoire ouvert et sommaire. La circulation de l'hémolymphe est généralement aidée par un vaisseau dorsal bombé formant un cœur et entouré d'un sinus qui permet de propulser et de disperser l'hémolymphe à travers le réseau artériel (Sonenshine and Roe, 2014a). L'hémolymphe remplit la cavité interne appelée hémocèle, baignant ainsi la totalité des organes internes, ainsi que le capitulum et les pattes. L'hémolymphe présente plusieurs fonctions dont le transport de métabolites et d'hormones, le maintien de la pression osmotique, et la régulation du système immunitaire (Sonenshine and Roe, 2014a). Elle est constituée de plasma riche en protéines et de cellules appelées hémocytes qui sont les cellules du système immunitaire inné des tiques capables de synthétiser des peptides antimicrobiens (McCoy and Boulanger, 2015) (Figure 6).

### **1.2.2.7. Le système nerveux**

Le synganglion, encore appelé ganglion cérébroïde, constitue le système nerveux de la tique, et est situé dans la zone péri-oesophagienne. A partir du synganglion, des nerfs périphériques s'étendent sur toute la région du corps et des appendices (Sonenshine and Roe, 2014a). Peu de données sont actuellement disponibles sur le fonctionnement du système nerveux de la tique, toutefois les neuropeptides synthétisés par les cellules neurosécrétrices semblent être impliqués dans le contrôle des fonctions vitales de la tique (McCoy and Boulanger, 2015).

### **1.2.2.8. Le système reproducteur**

En dehors de quelques exceptions, les tiques présentent une reproduction sexuée obligatoire. Chez le mâle l'appareil reproducteur est constitué de deux testicules tubulaires, prolongés par les canaux déférents qui débouchent sur le canal éjecteur. Chez la femelle l'appareil reproducteur est constitué d'un ovaire formant un chapelet en forme de U dont chacune des extrémités est prolongée par un oviducte. Les oviductes se rejoignent et s'unifient pour s'ouvrir sur le vagin. Le vagin est composé d'une ouverture externe menant à l'orifice génital externe et d'une ouverture interne menant vers le réceptacle séminal qui stocke les spermatozoïdes. Les appareils reproducteurs mâle et femelle sont également équipés de glandes accessoires (McCoy and Boulanger, 2015).

## ***1.2.3. Cycle de vie et écologie des tiques***

### **1.2.3.1. Le cycle de développement**

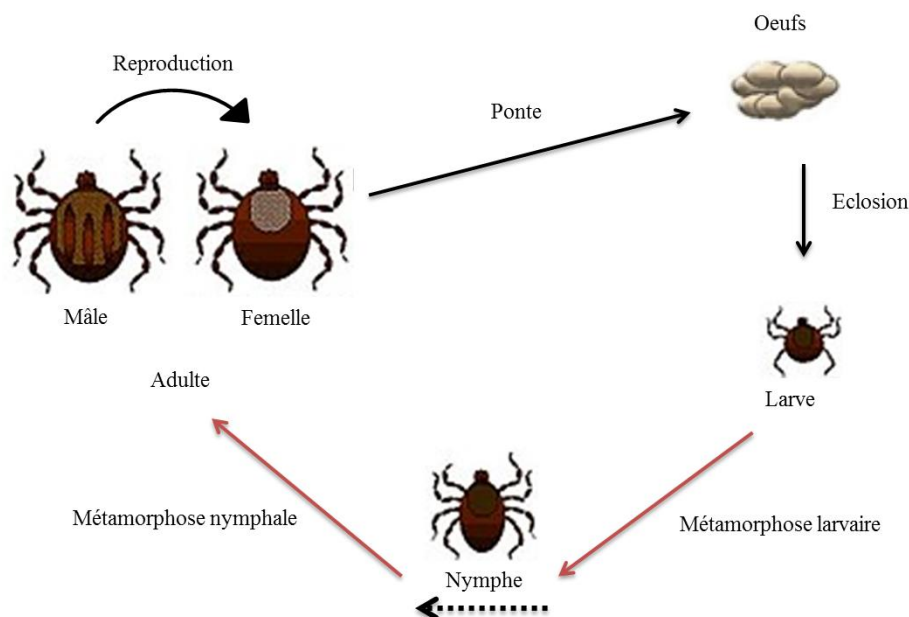
- Les stases de développement

Les tiques présentent un cycle de développement à trois stases : la larve, la nymphe et l'adulte (mâle ou femelle) (Figure 7). Chaque stase est séparée par une métamorphose qui fait suite à la prise d'un repas sanguin : la métamorphose larvaire, où la larve mue en nymphe, et la métamorphose nymphale, où la nymphe mue en adulte. La larve, issue de la maturation des œufs (embryogénèse) en plus de sa petite taille, se distingue par la présence de trois paires de

pattes au lieu des quatre observées chez la nymphe et l'adulte. La nymphe ne présente aucun dimorphisme sexuel, et se différencie notamment de l'adulte par l'absence de pore génital (McCoy and Boulanger, 2015).

- La reproduction

Le mâle introduit son rostre dans l'orifice génital de la femelle pour y déposer un spermatophore au sein duquel les spermatozoïdes déposés pourront réaliser leur maturation. Selon les espèces, les mâles ou les femelles sont capable de produire des phéromones qui permettent d'attirer le partenaire (McCoy and Boulanger, 2015). Une fois fécondée, et après gorgement, la femelle va pondre les œufs dans l'environnement, c'est le processus d'oviposition. La quantité d'œufs déposés va dépendre de la quantité de sang pris au cours du repas et de l'espèce de tiques. De même la durée de la ponte est variable selon les espèces et peut aller de 5 à 20 jours (McCoy and Boulanger, 2015).



**Figure 7. Cycle de vie des tiques. Les flèches rouges correspondent aux étapes de métamorphose. La flèche en pointillée noire fait référence aux Argasidae, et à la présence de plusieurs stades de développement au cours de la stase nymphale.**

- Les différences biologiques entre les Argasidae et les Ixodidae

Des différences biologiques fondamentales distinguent les cycles de vie des Argasidae de ceux des Ixodidae, dont les plus significatives sont résumées dans le Tableau 1, tiré du McCoy and Boulanger, 2015.

**Tableau 1 : Différences majeures dans la biologie des tiques molles et des tiques dures. (L : larve ; N : nymphe ; A : adulte), Tableau tiré du livre « Tique et maladies à tique » McCoy and Boulanger, (éditeurs), 2015 (page 63).**

Traits	<i>Ixodidae</i>	<i>Argasidae</i>
Nombre de stases	3	3
Nombre de stades	3	1 L Variable pour N et A
Nombre des repas	L : 1 N: 1 A : 1	L: 0 ou 1 Variable pour N et A
Durée du repas	Longue (4 à 10 jours)	Courte (mins à heures)
Ponte	1 seule de 1000 à 20000 oeufs	20 à 500 œufs/repas
Transsudation postprandiale*	Glandes salivaires	Glandes coxales
Tropisme d'hôte	Peu ou pas marqué	Marqué

\* Elimination de l'eau provenant de la concentration du repas sanguin absorbé

Chez les Argasidae, contrairement aux Ixodidae, la stase nymphale présente plusieurs stades de développement, allant de 2 à 8 stades selon les espèces qui correspondent à des mues de croissance au cours desquelles les nymphes augmentent leur taille sans métamorphose. Le repas larvaire est généralement long et peut durer plusieurs jours, contrairement aux nymphes et adultes qui se nourrissent en quelques heures voire minutes. Chez certaines espèces la métamorphose larvaire peut avoir lieu sans prise de repas sanguin (Boulanger and McCoy, 2017). Suite à un nombre variable de repas et de mues de croissance, la nymphe se métamorphose en adulte, mâle ou femelle. L'accouplement peut être multiple, et a lieu en dehors de l'hôte. Après un court repas, la femelle fécondée repart dans son

environnement afin de pondre les œufs (oviposition). Le nombre de fécondation, pontes et œufs va dépendre de l'espèce de tique molle (Boulanger and McCoy, 2017).

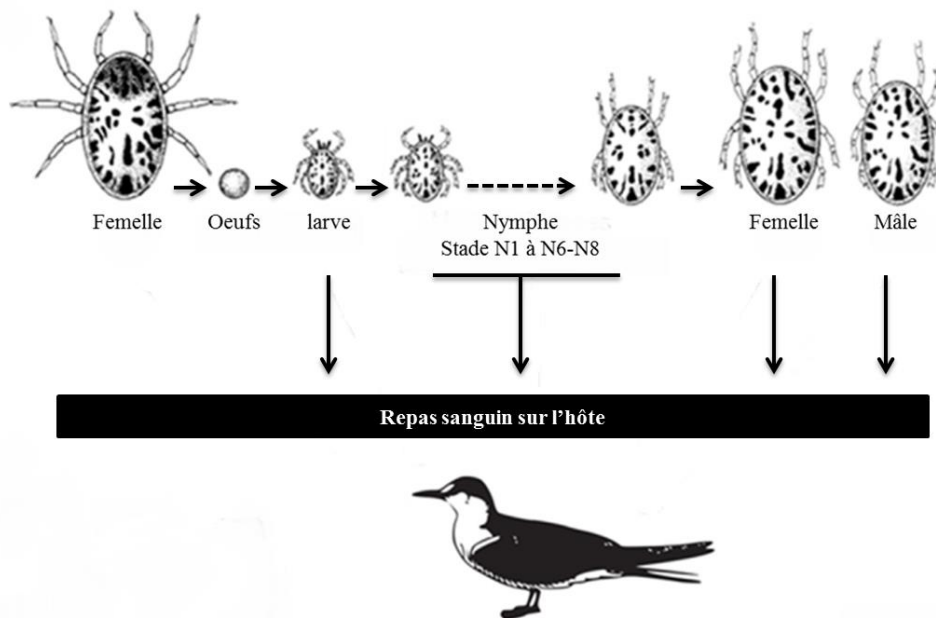
Chez les Ixodidae, un seul repas sanguin est réalisé par stase de vie. Les durées des repas sont généralement de l'ordre de quelques jours. L'accouplement a lieu soit sur l'hôte soit dans l'environnement extérieur, et se fait avant ou au cours du repas de la femelle. Une fois fécondée, la femelle passe d'une phase de gorgement lente à une phase de gorgement rapide, puis à réplétion, tombe au sol, réalise son unique ponte et meurt. Le nombre d'œufs pondus va dépendre là encore de l'espèce de tique en question (Boulanger and McCoy, 2017). On a longtemps pensé que les femelles ne s'accouplaient qu'une fois et que les mâles pouvaient féconder différentes femelles, mais des études récentes ont mis en évidence des paternités multiples au sein d'une même ponte qui remettent en question ce postulat (Ruiz-López et al., 2012 ; McCoy and Boulanger, 2015).

#### **1.2.3.2. Les différents cycles de vie des tiques**

Les tiques sont des ectoparasites qui au cours de leur vie alternent des phases de vie libre dans l'environnement, et des phases de vie parasitaire lorsqu'elles se nourrissent du sang de leur hôte. Les cycles de vie des tiques sont généralement longs, variant selon les espèces et s'étalant sur quelques années (McCoy and Boulanger, 2015). La phase parasitaire, qui correspond à la prise du repas sanguin est plutôt courte, allant de quelques minutes pour certaines Argasidae, à quelques jours pour les espèces Ixodidae. La durée de la phase de vie libre est généralement plus longue et varie selon les espèces de tiques et les conditions environnementales telles que la température ou l'hygrométrie. Elle dépend essentiellement de la durée associée aux diapauses morphogéniques (ou développementales) qui incluent les temps de réalisation des métamorphoses, de l'ovogenèse (ponte des œufs) et de l'embryogénèse (maturation des œufs) (McCoy and Boulanger, 2015). Il existe également des diapauses comportementales chez certaines tiques qui peuvent augmenter la durée de la phase de vie libre. Les diapauses comportementales correspondent à des phases d'inactivité de la tique qui s'observent en cas de conditions environnementales défavorables (McCoy and Boulanger, 2015).

Selon les espèces de tiques, il existe différents cycles biologiques qui sont définis par le nombre d'hôtes nécessaire pour accomplir son cycle de développement.

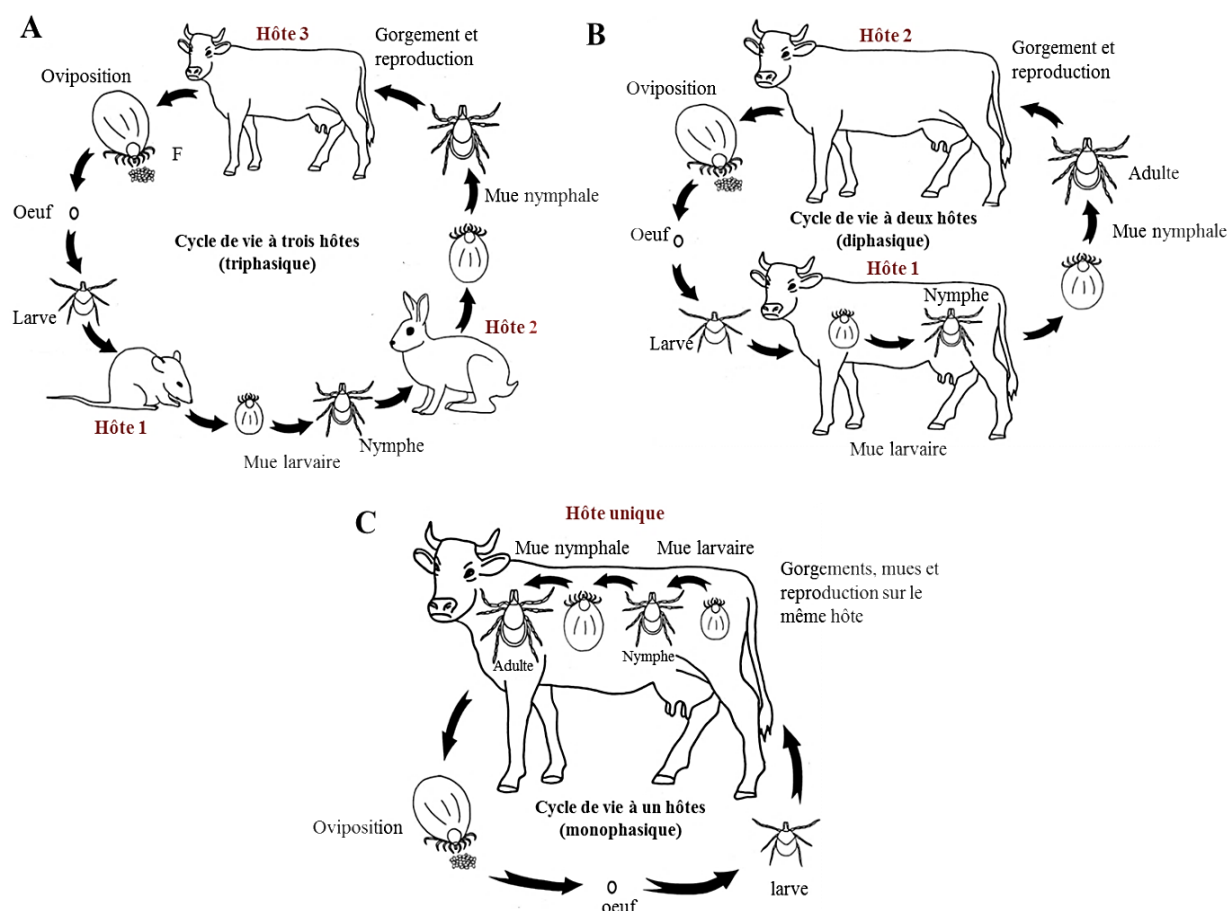
Le cycle polyphasique (ou polyxène) est défini par la présence de multiples stades parasites, et est caractéristique des tiques molles dont les nymphes et les adultes se nourrissent plusieurs fois au cours de leur vie (Figure 8) (Pérez-Eid, 2007).



**Figure 8.** Exemple du cycle de vie polyphasique des Argasidae, tiré de McKoy *et al.*., 2016.

Les tiques dures suivent des cycles soit mono-, di- ou tri-phasique (Figure 9). Le cycle triphasique (ou trixène) comporte trois phases parasites distinctes : la larve, la nymphe et l'adulte effectuent leur repas sur trois hôtes différents (Pérez-Eid, 2007). Entre les repas, chaque stase tombe au sol, accomplit sa mue puis parasite un nouvel hôte. La majorité des Ixodidae suivent ce type de cycle, telles que les tiques des genres *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Haemaphysalis*, *Ixodes*, et celles de certaines espèces des genres *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma* (Sonenshine and Roe, 2014a).

Le cycle diphasique (ou dixène) comporte deux phases parasites, la larve et la nymphe se nourrissent sur le même hôte, puis la nymphe tombe et elle réalise sa métamorphose, et l'adulte parasite un nouvel hôte. C'est le cas de certaines espèces de tique appartenant aux genres *Hyalomma* et *Rhipicephalus* (Sonenshine and Roe, 2014a).



**Figure 9. Exemple des cycles de vie des Ixodidae : les cycles à trois (A), deux (B) ou un (C) hôte, d'après Sonenshine and Roe, 2014a.**

Finalement le cycle monophasique (ou monoxène) est constitué d'une seule phase parasitaire, toutes les stases se réalisent et se nourrissent sur un même hôte, sans retour au sol. C'est le cas par exemple des tiques appartenant à l'ancien groupe des *Boophilus* maintenant rattaché au genre *Rhipicephalus*, telles que *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus annulatus* ou encore de *Dermacentor nitens* (Sonenshine and Roe, 2014a).

A noter que certaines espèces de tiques suivent des cycles di- ou mono-phasique facultatifs, signifiant que les conditions climatiques, la nature et l'abondance en hôtes détermineront le nombre d'hôtes parasités pour accomplir leur cycle de vie (Sonenshine and Roe, 2014a).

### 1.2.3.3. Ecologie des tiques et préférences trophiques

La majorité des Argasidae sont des tiques dites nidicoles, endophiles, elles évoluent à proximité de leur hôte dans des abris, de type nids, terriers, grottes, etc..., à proximité de leur hôte (Vial, 2009). Les tiques nidicoles chassent dès que l'hôte est disponible au sein de l'abri, elles sont donc adaptées à de longues périodes de survie sans repas (Sonenshine and Roe, 2014a). Bien que rare, il existe quelques exemples de tique Argasidae de type exophile, par exemple *Ornithodoros saignyi* (Boulanger and McCoy, 2017).

La majorité des Ixodidae sont dites exophiles, évoluant dans des écosystèmes dit ouverts ou semi-ouverts très variés tels que les forêts, les prairies, les savanes, mais également en zone (péri)-urbaine, par exemple dans les parcs et jardins publics (Boulanger and McCoy, 2017). Les tiques exophiles sont donc plus exposées et doivent s'adapter aux variations des facteurs environnementaux tels que la température ou l'humidité. Les tiques exophiles présentent deux types de stratégies de recherche d'hôte, soient elles sont dites à l'affût, soient en chasse active (Boulanger and McCoy, 2017). Les tiques à l'affût se positionnent plus ou moins en hauteur dans la végétation et attendent le passage d'un hôte pour s'y fixer. A l'inverse les tiques qui chassent activement passent à l'attaque dès lors qu'elles localisent un hôte (Boulanger and McCoy, 2017). Certaines espèces Ixodidae sont considérées comme endophiles, elles évoluent généralement dans des environnements intérieurs en forte interaction avec leur hôte, mais sont aussi capable de survivre en extérieur, c'est le cas par exemple de *Rhipicephalus sanguineus* (McCoy and Boulanger, 2015, Estrada Pena., 2010).

Les tiques sont aussi classées en fonction de la nature des hôtes parasités et de leurs préférences trophiques (McCoy and Boulanger, 2015). Certaines tiques Ixodidae, généralement exophiles, sont dites opportunistes et peuvent parasiter une très large gamme d'hôte, notamment les stases immatures (larves et nymphes). A l'inverse, certaines tiques présentent des préférences trophiques plus marquées, se nourrissant sur des gammes d'hôtes spécifiques. Les tiques dites monotropes (ou monoxène) se nourrissent sur le même type hôte, quelle que soit la stase de développement. Ce sont généralement des tiques endophiles vivant à proximité de leur hôte dans des abris protégés, ou certaines tiques exophiles dont l'hôte préférentiel est en abondance (Boulanger and McCoy, 2017, McCoy and Boulanger, 2015). Les tiques ditropes sont définies par une préférence trophique des stases immatures différente de celle des adultes. Finalement, chez les tiques télotropes les différentes stases, larves, nymphes et adultes se nourrissent sur des types d'hôtes très variés (Boulanger and McCoy, 2017).



### **1.3. Importance médicale et vétérinaire des tiques**

#### ***1.3.1. Impact direct et indirect des tiques en santé humaine et animale***

Les tiques ont un impact significatif en santé animale et en santé humaine. Bien qu'elles soient naturellement des ectoparasites d'animaux sauvages et domestiques, qui font partie intégrante de leur cycle de vie, l'Homme, en s'introduisant dans leurs biotopes peut être un hôte dit accidentel (Pérez-Eid, 2007). En termes d'impact médical, les tiques ont un effet direct sur la santé de leur hôte, via leur comportement d'ectoparasite hématophage, et indirect, en étant vecteur d'une multitude d'agents pathogènes.

##### **1.3.1.1. Impacts sanitaires directs des tiques**

L'impact direct des tiques sur la santé de leur hôte se constate tout particulièrement en santé animale, et entraînent des pertes économiques significatives pour les industries de l'élevage.

Certaines espèces de tiques, notamment les spécimens tropicaux comme les *Amblyomma*, peuvent prélever jusqu'à 4mL de sang lors de leur gorgement. Un fort taux d'infestation par ces tiques de l'hôte peut entraîner des cas de spoliation sanguine, avec une anémie et un affaiblissement important de l'animal.

Lorsque la tique se fixe à l'hôte, le rostre, composé des chélicères et de l'hypostome, qui est plus ou moins long selon l'espèce de tique, va pénétrer la peau de l'hôte. La piqûre de la tique constitue une plaie cutanée qui peut engendrer l'apparition de surinfections, l'introduction d'agents pathogènes opportunistes ou la formation d'abcès. Par exemple, la dermatophilose bovine induite par la bactérie *Dermatophilus congolensis* est largement associée à des cas d'infestation de l'animal par des tiques *Amblyomma variegatum*, dont les sites de gorgement sont des voies d'entrée de l'agent pathogène (Jongejan and Uilenberg, 2004). Enfin, les industries du cuir sont particulièrement affectées par la détérioration de la peau de l'animal liée à une infestation par les tiques.

De plus, les infestations des animaux domestiques par les tiques peuvent entraîner une baisse importante de productivité pour les industries de l'élevage, avec une détérioration de la qualité de la viande et du lait (Jongejan and Uilenberg, 2004).

Finalement, la salive des tiques est constituée d'une grande variété de molécules qui sont injectées dans le site de gorgement au cours du repas sanguin. Certains de ces composés vont agir sur le système immunitaire de l'hôte et avoir un effet immunosuppresseur, d'autres encore vont favoriser la transmission d'agents pathogènes (Kazimírová and Štibrániová, 2013). Chez certaines espèces de tiques la salive contient également des molécules pouvant déclencher des allergies, et également des molécules toxiques pour l'hôte, animal ou humain, entraînant des cas de toxicoses ou de paralysies qui peuvent s'avérer fatales (Mans *et al.*, 2004).

#### **1.3.1.2. Impacts sanitaires indirects des tiques**

Les tiques font partie des arthropodes vecteurs d'agents pathogènes les plus significatifs sur le plan vétérinaire et médical. Environ 10% des tiques décrites sont impliquées dans l'épidémiologie de maladies vectorielles. En santé animale ce sont les vecteurs les plus importants, elles se placent avant le moustique, et en santé humaine, elles se placent en deuxième position. Elles assurent une transmission active (mécanique ou biologique) d'un agent infectieux d'un vertébré vers un autre vertébré. A l'échelle mondiale, les tiques sont responsables de la transmission de la plus grande variété d'agents pathogènes, elles transmettent des microorganismes responsables de maladies bactériennes (borréliose de Lyme, les rickettsioses) ou parasitaires (babésioses, theilérioses), ou même virales (encéphalite à tiques). Les microorganismes responsables de ces maladies constituent un risque majeur que ce soit pour la santé humaine ou animale, les tiques pouvant parasiter de nombreuses espèces d'hôtes, affectant aussi bien la faune sauvage, le bétail que les animaux de compagnie ou encore l'homme. Les coûts financiers associés aux maladies à tiques sont considérables en santé publique et vétérinaire (Jongejan and Uilenberg, 2004). Les tableaux 2 à 7 décrivent les principaux agents pathogènes transmis par les tiques dans le monde, leurs vecteurs, leurs manifestations cliniques et leur distribution géographique. Ces tableaux ont été tirés du livre « Tique et maladies à tique », McCoy and Boulanger (éditeurs), 2015.

Tableau 2: Les espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato, leurs vecteurs, leurs manifestations cliniques et leur répartition géographiques. Tableau tiré du livre « Tique et maladies à tique », McCoy and Boulanger (éditeurs), 2015 (page 197).

Espèce de <i>Borrelia</i>	Répartition géographique	Vecteurs principaux	Hôtes / réservoir principaux connus	Pouvoir pathogène
<i>B. afzelii</i>	Europe Asie	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>	Rongeurs	Borréliose de Lyme (atteinte cutanée - ACA*)
<i>B. americana</i>	Amérique du nord	<i>I. minor</i>	Oiseaux	Non pathogène
<i>B. andersoni</i>	Amérique du nord	<i>I. dentatus</i>	Lapin	Non pathogène
<i>B. bavariensis</i>	Europe	<i>I. ricinus</i>	Rongeurs	Borréliose de Lyme (neuroborréliose)
<i>B. bissettii</i>	Europe Amérique du nord	<i>I. ricinus</i> <i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i>	Rongeurs	Potentiellement pathogène
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Europe Amérique du nord	<i>I. ricinus</i> <i>I. uriae</i> (Suède, Islande, Norvège) <i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i>	Rongeurs	Borréliose de Lyme (préférentiellement arthrites)
<i>B. californensis</i>	Etats Unis	<i>I. jellisonii</i> <i>I. pacificus</i> <i>I. spinipalpis</i>	Cerf hémione	Non pathogène
<i>B. carolinensis</i>	Etats Unis	<i>I. minor</i>	Rongeurs Oiseaux	Non pathogène
<i>B. finlandensis</i>	Europe	<i>I. ricinus</i>	Lièvre variable	Non pathogène
<i>B. garinii</i>	Europe Asie, Amérique du Nord & Iles Arctiques et sub-Antarctiques	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i> <i>I. uriae</i>	Oiseaux Rongeurs Oiseaux marins	Borréliose de Lyme (neuroborréliose)
<i>B. japonica</i>	Japon	<i>I. ovatus</i>	Rongeurs	Non pathogène
<i>B. kurtenbachii</i>	Etats-Unis	<i>I. scapularis</i>	Rongeurs	Potentiellement pathogène
<i>B. lusitaniae</i>	Europe Afrique du nord	<i>I. ricinus</i> <i>I. uriae</i>	Lézard Rongeurs Oiseaux de mer	Potentiellement pathogène
<i>B. sinica</i>	Chine	<i>I. ovatus</i>	Rongeurs	Non pathogène
<i>B. spielmanii</i>	Europe	<i>I. ricinus</i>	Loir Rongeurs	Borrélioses de Lyme (atteinte cutanée - ACA*)
<i>B. tanukii</i>	Japon	<i>I. tanuki</i>	Inconnu ?	Non pathogène
<i>B. turdi</i>	Japon	<i>I. turdus</i>	Oiseaux	Non pathogène
<i>B. valaisiana</i>	Europe Asie	<i>I. ricinus</i> <i>I. columnae</i> <i>I. nipponensis</i>	Oiseaux Lézards	Potentiellement pathogène
<i>B. yangtze</i>	Asie	<i>I. granulatus</i> <i>I. nipponensis</i>	Rongeurs	Non pathogène

\* ACA : acrodermatite chronique atrophiante

Tableau 3: Les espèces de *Borrelia* agents de fièvres récurrente, leur vecteurs, leurs manifestations cliniques et leur répartition géographiques. Tableau tiré du livre « Tique et maladies à tique » McCoy and Boulanger, (éditeurs), 2015 (page 202).

Espèces de Borréliés	Vecteur	Hôtes	Manifestations cliniques (autres que les fièvres récurrentes)	Répartition géographique
<i>B. recurrentis</i>	<i>Pediculus humanus</i> (pou)	homme		cosmopolite
<b>ANCIEN MONDE</b>				
<i>B. caucasica</i>	<i>Ornithodoros asperus</i>	rongeur	Syndrome pseudo grippal,	Caucase, Arménie, Azerbaïdjan, Géorgie
<i>B. crociduræ</i>	<i>O. sonrai</i>	rongeurs, renard	Atteintes neurologiques fréquentes	Afrique du nord et Afrique de l'ouest
<i>B. duttoni</i>	<i>O. moubata</i>	phacochère, pores-épics, oryctéropes, homme	Poussées fébriles atypiques et brèves, complications hépatorénales et oculaires	Afrique centrale, orientale et australe, Madagascar
<i>B. hispanica</i>	<i>O. erraticus</i>	rongeurs, renard, hérisson, porc, homme	Début brutal, formes méningées fréquentes	Espagne, Portugal, Grèce, Turquie, Afrique du nord
<i>B. latyschewi</i>	<i>O. tartarowsky</i>	rongeur, hérisson, tortue		Iran, Asie centrale soviétique, Kazakhstan
<i>B. persica</i>	<i>O. tholozani</i>	rongeur, homme	Syndrome pseudo grippal, convulsions, accès de délire	Moyen-Orient, Asie centrale, Egypte
<b>NOUVEAU MONDE</b>				
<i>B. graingeri</i>	<i>O. graingeri</i>		Pathogénicité incertaine	Afrique du sud
<i>B. hermsi</i>	<i>O. hermsi</i>	rongeurs, écureuils	Syndrome pseudo grippal,	Canada, Etats-Unis
<i>B. mazottii</i>	<i>O. talaje</i>	chauve-souris, oiseaux, rongeurs		Amérique centrale et du sud
<i>B. parkeri</i>	<i>O. parkeri</i>	écureuils, rongeurs	Syndrome pseudo grippal,	Canada, Etats-Unis
<i>B. tillae</i>	<i>O. zumpti</i>		Pathogénicité incertaine	Afrique du sud
<i>B. turicatae</i>	<i>O. turicata</i>	rongeur, serpents, rapaces, homme	Syndrome pseudo grippal, Atteintes neurologiques	Canada, Etats-Unis, Mexique
<i>B. venezuelensis</i>	<i>O. rudis</i>	rongeurs		Amérique centrale et du sud
<b>Borrelies transmises par des tiques « dures » («Relapsing like fever»)</b>				
<i>B. miyamotoi</i>	<i>Ixodes persulcatus</i> <i>I. ricinus</i> <i>I. scapularis</i>	mammifères, oiseaux, reptiles	Syndrome pseudo grippal atteinte neurologique possible	Japon, Europe, Etats-Unis
<i>B. lonestari</i>	<i>Amblyomma americanum</i>	mammifères, oiseaux		Etats-Unis

Tableau 4 : Les espèces de *Rickettsia* du groupe des fièvres pourprées, leurs vecteurs, leurs manifestations cliniques et leur répartition géographiques. Tableau tiré du livre « Tique et maladies à tique » McCoy and Boulanger, (éditeurs), 2015 (page 204).

Maladie	Agent infectieux	Tiques vectrices	Répartition géographique	Réservoir potentiel	Érupt.	Escarre d'inoculation
Fièvre boutonneuse méditerranéenne	Complexe de <i>R. conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Haemaphysalis leachi</i>	pourtour méditerranéen Afrique, Moyen-Orient.	Chien ? Rongeurs ? Lagomorphes?	oui	oui Rh. conorii  non Rh. subsp.
Érythème atypique Tibola, Senlat	<i>R. slovaca</i> <i>R. raoultii</i>	<i>Dermacentor marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i> <i>R. pumilio</i>	Slovaquie, France, Hongrie, Suisse Eurasie	Chien ?	rare	oui adénopathies
Fièvre éruptive Lar	<i>R. sibirica</i> <i>mongolotimonae</i>	<i>Hyalomma</i> spp. <i>R. pusillus</i> ?	Mongolie, France, Portugal	?		oui adénopathies lymphangite
Rickettsiose anéruptive	<i>R. helvetica</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Europe, Japon	Cervidés	non	non
Rickettsiose à <i>R. massiliae</i>	<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i> , <i>R. spp.</i>	Pourtour méditerranéen, Mali, Canaries	?	oui	oui
Typhus sibérien	<i>R. sibirica</i>	<i>Dermacentor</i> spp . <i>Hyalomma</i> spp. <i>Ha. concinna</i> .	Sibérie, Mongolie, Pakistan		oui	oui
Rickettsiose à tique africaine	<i>R. africae</i>	<i>Amblyomma</i> spp. <i>R. decoloratus</i>	Afrique subsaharienne, Éthiopie, Antilles, Réunion Nouvelle Calédonie		oui	oui multiples + adénopathies
Fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses	<i>R. rickettsii</i>	<i>Dermacentor</i> spp . <i>R. sanguineus</i> <i>Amblyomma</i> spp	Amérique du Nord Amérique du Sud	Chien ? Lapin, Rongeurs, Sarigue.	oui	non
Fièvre du Queensland	<i>R. australis</i>	<i>Ixodes holocyclus</i> . <i>Ixodes</i> spp.	Australie		oui	oui 65 %

**Tableau 5 : Les espèces *Ehrlichia* et *Anaplasma*, leurs vecteurs, leurs manifestations cliniques et leur répartition géographiques. Tableau tiré du livre « Tique et maladies à tique » McCoy and Boulanger, (éditeurs), 2015 (page 204).**

Agent	Maladie	Tiques vectrices	Principaux Hôtes	Distribution géographique
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Anaplasmose granulocytaire humaine et animale	<i>Ixodes</i> spp. :	Ruminants domestiques, chiens, chevaux, rongeurs	Mondiale
<i>A. marginale</i>	Anaplasmose bovine	<i>Dermacentor</i> spp. <i>Rhipicephalus</i> spp.	Bovins, ruminants sauvages	Régions tropicales et subtropicales
<i>A. centrale</i>	Anaplasmose bovine atténuée	<i>R. simus</i>	Bovins	Régions tropicales et subtropicales
<i>A. ovis</i>	Anaplasmose ovine	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp.	Ovins, Caprins, ruminants sauvages	Europe, USA
<i>A. bovis</i>	Anaplasmose bovine	<i>Amblyomma</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp.	Bovins, buffles, bisons	Afrique, Amérique du Sud, Asie
<i>A. platys</i>	Thrombocytopénie infectieuse cyclique	<i>R. sanguineus</i>	Chiens	Europe, USA, Asie
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	-Ehrlichiose monocyttaire humaine -Ehrlichiose canine	<i>A. americanum</i>	Cerf de Virginie	USA, Amérique du Sud, Afrique, Asie
<i>E. canis</i>	-Ehrlichiose monocyttaire canine -Ehrlichiose humaine	<i>R. sanguineus</i> , <i>D. variabilis</i>	Chiens, canidés sauvages	Mondiale
<i>E. ewingii</i>	-Ehrlichiose humaine à ewingii -Ehrlichiose canine	<i>A. americanum</i>	Cerf de Virginie, chiens,	USA, Afrique, Asie
<i>E. muris</i>	Splénomégalie murine	<i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Ixodes</i> spp.	Petits rongeurs	Eurasie
<i>E. ruminantium</i>	- Cowdriose des ruminants - Ehrlichiose du chien et de l'homme	<i>Amblyomma</i> spp.	Bovins, Ovins, Caprins, quelques ruminants sauvages	Afrique, Caraïbes
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	Rares cas d'infections humaines	<i>Ixodes</i> spp.	Petits rongeurs	Eurasie

**Tableau 6 : Arbovirus d'intérêt médical, leurs vecteurs, leurs manifestations cliniques et leur répartition géographiques. Tableau tiré du livre « Tique et maladies à tique » McCoy and Boulanger, (éditeurs), 2015 (page 214-215).**

Famille / genre	Virus (Complexe-Virus)	Manifestation clinique	Tiques vectrices	Réservoir	Répartition géographique
<i>Reoviridae / Orbivirus</i>	Kemerovo, Tribec, Lipovnik, Kharagyschi	Encéphalite, Méningo-encéphalite	<i>I. persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>H. punctata</i>	Oiseaux, Petits mammifères	Europe de l'Est (Sud-Est de la France ??)
<i>Reoviridae / Coltivirus</i>	Fièvre à tiques du Colorado (Colorado tick fever)	Fièvre bi-phasique de type dengue	<i>D. andersoni</i>	Ecureuil terrestre, autres rongeurs	Amérique du Nord
	Eyach	Troubles neurologiques, Encéphalites	<i>I. ricinus</i> , <i>I. ventralloii</i>	Mammifères; Lagomorphes, Oiseaux	France, Allemagne
<i>Flaviviridae / Flavivirus</i>	Maladie de la forêt de Kyasanur (Kyasanur Forest Disease)	Méningo-encéphalites, fièvre hémorragique	<i>H. spinigera</i> , <i>Haemaphysalis</i> spp.	Singes, Rongeurs	Inde
	Encéphalite à tique (Tick-borne encephalitis)	Encéphalites	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Rongeur	Europe, Asie
	Langat	Encéphalite	<i>I. granulatus</i> , <i>Haemaphysalis papuana</i>	Rongeurs	Malaisie, Thaïlande
	Meaban	Prurit, Syndromes grippaux	<i>Ornithodoros maritimus</i>	Oiseaux de mer	France (Bretagne)
	Fièvre hémorragique de Omsk (Omsk Haemorrhagic fever) °	Fièvre hémorragique	<i>D. reticulatus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Rongeurs	Sibérie
	Powassan et virus des tiques du cerf (Deer tick)	Méningo-encéphalites	<i>I. cookei</i> (nombreuses espèces <i>Dermacentor</i> , <i>Pholeoixodes</i> , <i>Ixodes</i> ...)	Vertébrés, Oiseaux et Mammifères	Etats-Unis, Canada, Russie
	Louping ill	Méningo-encéphalites	<i>I. ricinus</i>	Vertébrés, ovins	Iles britanniques
	Tyulenyi	Encéphalite	<i>I. uriae</i>	Oiseaux de mer	Amérique du Nord, Russie, Norvège
	Fièvre du Nil Occidental (West Nile)	Encéphalite	<i>D. reticulatus</i> , <i>R. sanguineus</i> , <i>Argasidés</i> spp.	Chevaux, Oiseaux, divers animaux	Europe (France, Camargue), Afrique, Amérique du Nord
<i>Asfarviridae / Asfivirus</i>	(Peste porcine Africaine) African Swine fever	Non Pathogène pour l'Homme	<i>O. moubata</i> , <i>O. erraticus</i>	Cochons sauvages, Phacochères	Afrique, Europe
<i>Orthomyxoviridae / Thogotovirus</i>	Thogoto	Méningo-encéphalites, hépatite	<i>B. decoratus</i> , <i>A. variegatum</i> , <i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp.	Ovins	Afrique, Sud de l'Europe
	Dhori	Méningo-encéphalites, hépatite (transmission par aérosol)	<i>Hyalomma dromedarii</i> , <i>H. marginatum</i>	Chameaux, chevaux, chauve-souris	Inde, Russie, Egypt, Portugal
<i>Bunyaviridae / Nairovirus</i>	Dugbe	Fièvre	<i>A. variegatum</i>	?	Afrique
	Maladie des moutons de Nairobi (Nairobi sheep disease)	Fièvre et courbatures	<i>R. appendiculatus</i> , <i>R. pulchellus</i>	Ovins	Afrique
	Fièvre Hemorragique de Crimée-Congo	Fièvre hémorragique sévère	<i>Hyalomma</i> spp., <i>Dermacentor</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp.	Lièvres, hérisson, rongeurs, ruminants, porc	Afrique, Asie, Balkans
	Ganjam °	Fièvre	<i>Haemaphysalis intermedia</i>	?	Inde
	Avalon	Prurit, Syndromes grippaux, Polyradiculonévrites	<i>I. uriae</i> , <i>I. signatus</i>	Oiseaux de mer	Canada, Russie, France (Bretagne)
	Erve	"Thunderclap headache"	<i>I. ricinus</i>	Mammifères, Oiseaux	France (Ouest)
	Soldado	Prurit, Syndromes grippaux	<i>O. maritimus</i>	Oiseaux de mer	France (Ouest et Sud)
<i>Bunyaviridae / Bunyavirus-Like</i>	Bhanja	Troubles neurologiques	<i>H. punctata</i> , grandes variété d'espèces	?	Afrique, Asie, Sud de l'Europe (France??)

Tableau 7 : Les principaux piroplasmes, leurs vecteurs, leurs manifestations cliniques et leur répartition géographiques. Tableau tiré du livre « Tique et maladies à tique » McCoy and Boulanger, (éditeurs), 2015 (page 222 et 225).

Hôte vertébré	Piroplasma	Tique vectrice	Répartition géographique
Vache	<i>T. parva</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Afrique centrale et de l'est
	<i>T. annulata</i>	<i>Hyalomma</i> spp.	Afrique du Nord, Chine, Inde, Asie centrale, Europe et Russie du sud
	<i>T. buffeli (orientalis)</i>	<i>H. longicornis</i>	Monde entier
	<i>T. sergenti</i>	<i>H. longicornis</i>	Japon, Chine, Corée
	<i>T. taurotragi</i>	<i>R. appendiculatus</i>	Afrique
	<i>T. mutans</i>	<i>Amblyomma</i> spp.	Afrique sub-saharienne
	<i>T. velifera</i>	<i>Amblyomma</i> spp.	Afrique
	<i>T. sinensis</i>	<i>H. qinghaiensis</i>	Chine
	<i>B. bovis</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Zones tropicales et subtropicales
	<i>B. bigemina</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Zones tropicales et subtropicales
	<i>B. divergens</i>	<i>I. ricinus</i>	Europe
	<i>B. major</i>	<i>H. punctata</i>	Europe, Afrique Nord, Asie, Chine
	<i>B. ovata</i>	<i>H. longicornis</i>	Japon, Chine, Asie de l'est
	<i>B. occultans</i>	<i>Hy. marginatum</i>	Afrique
Cheval	<i>T. equi</i>	<i>Dermacentor</i> spp.,	Zones tropicales et subtropicales
	<i>B. caballi</i>	<i>Hyalomma</i> spp.,	Bassin méditerranéen
		<i>Rhipicephalus</i> spp.	
Chien	<i>B. rossi</i>	<i>H. elliptica (leachi)</i>	Afrique
	<i>B. canis</i>	<i>Dermacentor</i> spp.	Europe, Asie
	<i>B. vogeli</i>	<i>R. sanguineus</i>	Monde entier
	<i>B. gibsoni</i>	<i>H. longicornis</i> , <i>H. bispinosa</i>	Asie
	<i>B. conradae</i>	Nd	Californie
	<i>B. microti-like</i> ( <i>T. annae</i> )	<i>I. hexagonus</i>	Europe du Sud
Homme	<i>B. divergens</i>	<i>I. ricinus</i>	Europe
	<i>B. microti</i>	<i>I. scapularis</i>	Etats-Unis (Nord Est)
	<i>B. duncani</i> (WA)	<i>I. pacificus</i> ?	Etats-Unis (Côte Pacifique)
	<i>Babesia</i> sp. EU1 ( <i>B. venatorum</i> )	<i>I. ricinus</i>	Europe
	<i>B. divergens-like</i> (MO1, WA1)	Nd	Etats-Unis (Missouri, Kentucky Washington)
	<i>B. microti-like</i>	<i>I. ricinus</i> ?	Asie, Australie, Allemagne



### ***1.3.2. Épidémiologie des maladies à tiques***

#### **1.3.2.1. Acquisition et transmission des agents pathogènes**

Les tiques acquièrent les agents pathogènes en se nourrissant sur des hôtes infectés au cours de leur repas. Par la suite, selon la nature de l'agent pathogène et selon l'espèce de tique, l'agent infectieux sera maintenu ou non au long du cycle de vie du vecteur (Figure 10). Lorsque l'agent pathogène est maintenu à travers les différentes stases, on parle alors de transmission transstadiale (Parola and Raoult, 2001). Cela signifie par exemple que si une larve se nourrit sur un hôte infecté, et acquiert l'agent pathogène, celui-ci pourra être maintenu à travers la métamorphose larvaire, et ainsi être transmis à la nymphe. De même, l'agent pathogène peut être maintenu lorsque la nymphe mue en adulte. Dans le cas de transmission transstadiale, la nymphe et les adultes sont les vecteurs de l'infection. Il existe également une transmission transovarienne des agents pathogènes (Parola and Raoult, 2001). La femelle infectée est alors capable de transmettre l'agent pathogène à sa descendance. Ainsi, la larve peut, elle aussi, être impliquée en tant que vecteur d'agent infectieux.

Il existe également deux autres voies de transmission d'un agent pathogène de tique à tique. Une plus minoritaire, la transmission sexuelle peut avoir lieu lorsqu'un mâle infecté est capable de transmettre l'agent pathogène à la femelle (Parola and Raoult, 2001). Enfin, la transmission par « co-repas » (*co-feeding* pour les anglophone) survient lorsque deux ou plusieurs tiques se gorgent à proximité et une tique infectée transmet l'agent pathogène à une tique non infectée via le site de piqûre, sans pour autant que l'hôte développe une infection (Parola and Raoult, 2001). La majorité des agents pathogènes transmis par les tiques sont ensuite transmis à l'hôte via la salive de la tique au cours du repas sanguin. Cependant, une transmission non salivaire des agents infectieux peut arriver: par contamination du site de piqûre avec une remontée des contenus digestifs, ou des parties buccales contaminées, par contact avec des fèces, ou fluides coxaux infectieux ou encore par ingestion de tique infectée (Baneth, 2014).

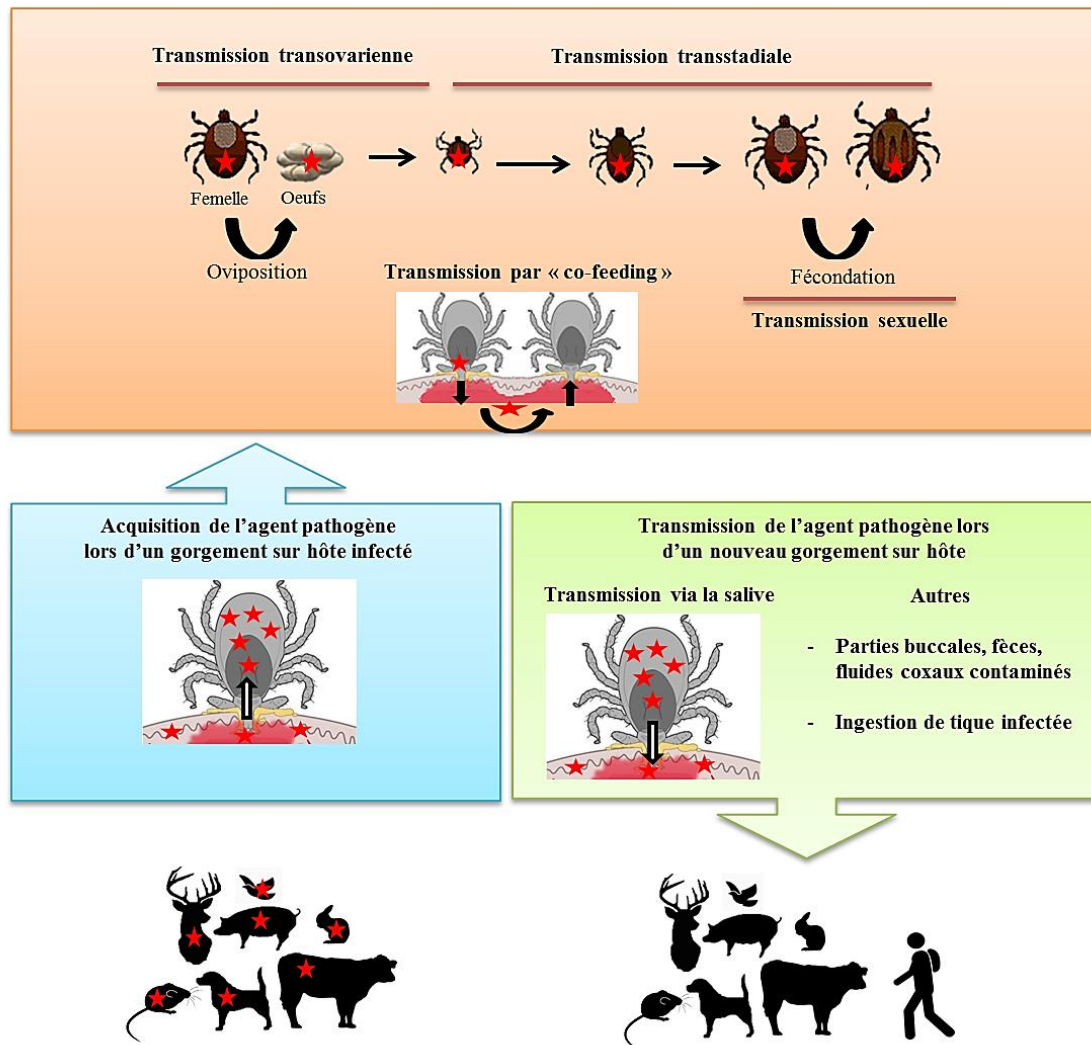


Figure 10. Schéma simplifié de l'acquisition et de la transmission des agents pathogènes par les tiques.

### 1.3.2.2. Capacité et compétence vectorielle

La compétence vectorielle décrit les interactions entre la tique et l'agent pathogène, elle reflète le niveau de compatibilité du système vecteur-microorganisme. Elle repose donc sur des paramètres intrinsèques tels que la génétique, la biologie moléculaire, la physico-chimie, et elle est spécifique d'un système tique-agent pathogène donné (De la Fuente *et al.*, 2017). La compétence vectorielle est donc définie par la réceptivité de la tique, sa capacité à s'infecter, et sa capacité à maintenir et pouvoir transmettre un agent pathogène. Une tique est considérée comme vecteur d'un agent pathogène si elle (1) est capable de se nourrir sur un hôte infecté, (2) peut acquérir l'agent pathogène au cours du repas sanguin (réceptivité du vecteur) (3) peut maintenir l'agent pathogène au cours d'une ou plusieurs étapes de son cycle

de vie et (4) est capable de transmettre l'agent pathogène à un hôte non infecté (Estrada pena 2013).

La transmission des agents pathogènes par les tiques dépend de nombreux facteurs complexes liés aux interactions entre les tiques, les hôtes disponibles, les agents pathogènes et leur environnement. La capacité vectorielle décrit l'aptitude plus ou moins importante de la tique à pouvoir transmettre un agent pathogène. Elle repose sur la compétence vectorielle de la tique ainsi que sur des déterminants bioécologiques de la tique, tels que l'abondance, la longévité ou encore les préférences trophiques. Elle est soumise aux effets des paramètres environnementaux (De la Fuente *et al.*, 2017).

Ainsi, les connaissances se rapportant à la bio-écologie des tiques est cruciale pour la compréhension et l'étude de l'épidémiologie des maladies à tiques. Dans une région géographique donnée, afin d'évaluer les risques d'émergence de maladies à tiques, il est nécessaire de connaître la diversité en espèces de tiques, la nature des hôtes disponibles, ainsi que la diversité en microorganismes et agents pathogènes.

## **2. Les tiques et les agents pathogènes transmis par les tiques dans la zone des Caraïbes**

Les Antilles se situent au cœur de la zone Néotropicale des Caraïbes, et constituent une zone à risque pour l'émergence de maladies vectorielles en raison des conditions climatiques favorables aux vecteurs et des échanges intercontinentaux (mouvements d'animaux, oiseaux migrateurs). Les maladies à tiques sont particulièrement contraignantes dans les pays tropicaux car elles affectent considérablement l'économie de l'élevage. Le développement de l'élevage est ainsi limité par le coût lié à la gestion et à la prévention des maladies à tiques (soins vétérinaires, traitement anti-acaricide, vaccin, etc.) et par l'impossibilité d'importer des races d'élevage non autochtones, plus productives mais plus sensibles aux maladies à tiques.

La situation épidémiologique de la zone Caraïbe vis-à-vis des maladies transmises par les tiques est très peu documentée. La diversité des espèces de tiques et des agents pathogènes transmis par les tiques est encore peu caractérisée. Les études, généralement anciennes, menées sur le terrain portent essentiellement sur les espèces de tiques et les agents pathogènes affectant les animaux d'élevage, tels que *Ehrlichia ruminantium* transmis par *Amblyomma variegatum* ou encore *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* et *Anaplasma marginale*, transmis par *Rhipicephalus microplus*. Ainsi, les données disponibles sont donc loin de pouvoir répondre aux questions concernant le risque d'émergence ou de réémergence des maladies à tiques dans les Caraïbes.

La revue qui va suivre fournit un état des lieux des connaissances épidémiologiques concernant les tiques et les maladies à tique dans les Caraïbes. Nous fournissons un inventaire le plus complet possible des espèces de tiques et des agents pathogènes affectant la santé humaine et animale tels que rapportés dans les Caraïbes. Nous discutons également des enjeux liés à l'épidémiologie des tiques et des agents pathogènes transmis par les tiques, et des défis à relever pour améliorer les systèmes de contrôle et de surveillance de ces maladies vectorielles dans les Caraïbes. Finalement, nous soulignons la nécessité de développer de nouveaux outils de surveillance permettant le criblage à haut débit d'agents pathogènes afin d'améliorer nos performances de veille sanitaire des maladies à tiques.

# Ticks and tick-borne pathogens of the Caribbean: current understanding and future directions for more comprehensive surveillance

Mathilde Gondard<sup>1,2</sup>, Alejandro Cabezas-Cruz<sup>1,3,4</sup>, Roxanne Albertha Charles<sup>5</sup>, Muriel Vayssier-Taussat<sup>1</sup>, Emmanuel Albina<sup>2,6</sup>, and Sara Moutailler<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, ANSES, INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France.

<sup>2</sup> CIRAD, UMR ASTRE, F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France.

<sup>3</sup> Faculty of Science, University of South Bohemia, 37005 Ceské Budejovice, Czech Republic.

<sup>4</sup> Institute of Parasitology, Biology Center, Czech Academy of Sciences, 37005 Ceské Budejovice, Czech Republic.

<sup>5</sup> The University of the West Indies, Faculty of Medical Sciences, School of Veterinary Medicine, Mt. Hope, Trinidad, West Indies.

<sup>6</sup> INRA, UMR 1319 ASTRE, F-34398 Montpellier, France.

\*Correspondence: Dr. Moutailler Sara, ANSES, [sara.moutailler@anses.fr](mailto:sara.moutailler@anses.fr)

**Keywords:** Tick-borne pathogens, Ticks, Caribbean, Epidemiology, New high-throughput technologies, surveillance.

## Abstract

Ticks are obligate hematophagous arthropods of significant importance to human and veterinary medicine. They transmit a vast array of pathogens, including bacteria, viruses, protozoa, and helminths. Most epidemiological data on ticks and tick-borne pathogens (TBPs) in the West Indies are limited to common livestock pathogens such as *Ehrlichia ruminantium*, *Babesia* spp. (i.e. *B.bovis* and *B.bigemina*), and *Anaplasma marginale*, and less information is available on companion animal pathogens. Of note, human tick-borne diseases (TBDs) remain almost completely uncharacterized in the West Indies. Information on TBP presence in wildlife is also missing. Herein, we provide a comprehensive review of the ticks and TBPs affecting human and animal health in the Caribbean, and introduce the challenges associated with understanding TBD epidemiology and implementing successful TBD management in this region. In particular, we stress the need for innovative and versatile surveillance tools

using high-throughput pathogen detection (e.g. high-throughput real-time microfluidic PCR). The use of such tools in large epidemiological surveys will likely improve TBD prevention and control programs in the Caribbean.

## Introduction

Ticks are obligate hematophagous arthropods of significant economic and sanitary importance affecting human and animal health worldwide. While acquiring a blood meal, ticks can both directly and indirectly harm the host. They are known to induce severe toxic conditions such as paralysis, allergies, abscesses, anemia, immunosuppression, and skin deterioration at the bite site (Mans *et al.*, 2004). More importantly, ticks can also transmit severe infections as they can be vector of various pathogens (de la Fuente *et al.*, 2017). Ticks are divided into three families: the Nuttalliellidae (comprising a single genus and species), the Ixodidae or hard ticks (that includes 14 genera and ~700 species), and the Argasidae or soft ticks (that includes 5 genera and ~200 species) (Guglielmone *et al.*, 2010; Manzano-Román *et al.*, 2012). Nearly 10% of the ~900 known tick species can transmit pathogens, and amongst all arthropods, ticks transmit the greatest variety of pathogenic microorganisms, including bacteria, viruses, protozoa, and helminths (Jongejan and Uilenberg, 2004).

Despite the high burden of animal and zoonotic infectious diseases in the West Indies, implementing integrative approaches to manage and control ticks and their pathogens remains challenging. Insufficient epidemiological knowledge on tick diversity and the tick-borne pathogens (TBPs) circulating in the region, combined with a lack of expertise in TBD management, limits the development of effective control strategies (Pegram *et al.*, 2007). Moreover, the Caribbean region is a cosmopolitan area, at the crossroads of intercontinental exchanges between the Americas, Europe, and Africa, which thus poses risks of tick and TBP introduction and dispersal, especially through animal movement (legal or illegal trade and bird migration) (George *et al.*, 2002). Therefore, new insights into tick and TBP epidemiology are needed to address TBD emergence in this area. Indeed, accurate knowledge about the diversity of TBPs circulating in a specific region is a critical step toward implementing effective TBD prevention and control programs.

Following a comprehensive review of the reported tick species and TBPs of medical and veterinary importance in the Caribbean, we discuss the challenges of TBD surveillance and management in the Caribbean. In addition, we highlight the importance of applying novel technologies for multiple parallel pathogen detection to support tick and TBP control programs.

## Tick vectors in the Caribbean

The Caribbean tick fauna is composed of both endemic species, and exotic species that have mostly been introduced by animal movements. Some tick species have been naturally imported by migratory or non-migratory birds originating from North, Central, or South America, while others were introduced by humans during the colonisation of the Americas with the arrival of infested cattle and dogs from Europe, Africa, and Asia (Morel, 1966; De la Cruz, 2001). Thus far, 56 tick species have been recorded in the Caribbean. They belong to 10 genera, and two families (Argasidae and Ixodidae) including 15 species of *Ornithodoros*, 10 species of *Antricola*, 17 species of *Amblyomma*, 3 species each of *Argas*, *Ixodes*, and *Rhipicephalus*, 2 species of *Haemaphysalis*, and 1 species each of *Parantricola*, *Dermacentor* (*Anocentor*), and *Aponomma* (De la Cruz, 2001; Basu and Charles, 2017). The life cycle for both male and female ticks includes three developmental stages (excluding eggs): larvae, nymphs (one nymphal stage in Ixodidae and several nymphal stages in Argasidae), and adults. Each of these stages can potentially acquire and transmit pathogens while feeding on a host. According to the tick species and to the pathogen, there are several ways of pathogen transmission from one tick to another and from one tick to a new host. Some tick species are able to maintain horizontally pathogens within the same generation (1) Tick may be able to transmit transstadially (or interstadially) pathogens, meaning that one tick developmental stage can acquire and then transmit pathogens to the next developmental stage, maintaining pathogens through the molts (2) Tick may be able to intrastadially transmit pathogens to the host, meaning that tick may be able to transfer pathogens from one host to another during the same developmental stage (3) Tick may be able of venereal transmission, when male tick transmits pathogens to the female tick during the mating (Connell and Hall, 1972; Parola and Raoult, 2001 ; Bremer *et al.*, 2005 ; Ueti *et al.*, 2008). Some tick species are also able of vertical maintenance, transmitting pathogens to the next generation. Infected female ticks may be able to transmit pathogens transovarially to their offspring, leading to infected larvae (Parola and Raoult, 2001). Finally, tick may be able of non-systemic transmission. When feeding on a host, ticks tend to form clusters (known as co-feeding), a behavior that—apart from facilitating blood feeding and mating—also assists in pathogen transmission from an infected tick to an uninfected one sharing the same blood meal (Randolph *et al.*, 1996). During co-feeding, ticks can transmit bacterial and viral pathogens to each other without the host bacteremia or viremia (Randolph *et al.*, 1996; Belli *et al.*, 2017). Finally, ticks can transmit biologically and mechanically pathogens to a new host. The majority of TBPs are transmitted to the host through the tick salivary glands via the saliva. Non-salivary TBP

transmission can also occur by contamination of the feeding site with infectious regurgitated midgut contents, feces, coxal fluid, or contaminated mouthparts (Parola and Raoult, 2001). Vertebrate host infection can also occur by orally ingesting infected ticks, as demonstrated for *Hepatozoon* spp. sporozoites transmission (Mathew *et al.*, 1998; Baneth *et al.*, 2001; Modry *et al.*, 2017).

Owing to their health impact, the most studied tick species in the West Indies are those associated with TBP transmission to livestock or pets. However, even though tick tropism for certain hosts is well-documented; these same ticks are able to parasitize different host species, including humans, thus posing a zoonotic risk (Parola *et al.*, 1999; Dantas-torres, 2010). Other tick species—mostly occurring in the wildlife population—are present within the Caribbean, but have not received much interest so far (De la Cruz, 2001; Basu and Charles, 2017). As the majority of emerging diseases originate from wildlife reservoirs, characterizing the diversity and ecology of ticks present in such wild environments should be addressed (Dantas-torres *et al.*, 2012; Baneth, 2014). The tick species described in this review are significantly involved in the epidemiology of animal TBDs (Table 1).

### ***Ixodid tick vectors in the Caribbean***

Ixodidae represent approximately 80% of the world's tick fauna. They can be morphologically distinguished from soft ticks due to the presence of a sclerotized scutum, and a capitulum harbouring the mouthparts originating from the anterior face (Estrada-Peña, 2015). Ixodidae may be one-, two- or three-host species depending on the number of host animals they need to complete their life cycle (Jongejan and Uilenberg, 2004). Hard ticks can present endophilous behaviour, living in proximity with the host in a protected environment, or/and exophilous behavior, where they live in an exposed environment, questing for a host (Estrada-Peña, 2015). Among the ixodid ticks implicated in Caribbean TBDs, the *Rhipicephalus* spp. *Amblyomma* spp., and *Dermacentor* spp. are the most commonly found (Table 1).

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, the tropical cattle tick, is considered to be the most important parasitic livestock tick worldwide. Although mainly associated to cattle, *Rh. microplus* is able to feed on a variety of hosts including buffaloes, horses, donkeys, goats, sheep, deer, pigs, dogs and some wild animals (Walker *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2007). Several cases of human paratization by *Rh. microplus* have been reported, but it is uncommon (Guglielmone *et al.*, 2006; Lamattina and Nava 2016). *Rh. microplus* are one-host ticks, meaning that they do not need to fall off of a host to molt, and specimens can spend their



entire life cycle on the same host. They are well distributed within the Caribbean, reported in both the Greater and Lesser Antilles (Camus and Barre, 1995). The cattle tick is mainly implicated in the transmission of bacteria and protozoa such as *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp., and *Theileria* spp. A national survey in 2000 reported that bovine babesiosis associated with *Rh. microplus* infestations caused economic losses of US \$6.7 million in the Puerto Rican cattle industry (Urdaz-Rodríguez *et al.*, 2009). Two successive tick eradication programs have been conducted in Puerto Rico, however due to many technical and socio-economic limitations; both projects failed and were abandoned (Crom, 1992; Pegram *et al.*, 2000).

*Amblyomma variegatum*, the tropical bont tick, is a three-host tick widely distributed throughout the Caribbean, parasitizing various vertebrate hosts which are mainly ruminants such as cattle and goats, and represents a major constraint to animal farming (Barré and Garris, 1990). They create deep skin lesions via their long mouthparts, and thus favor the development of secondary infections such as acute dermatophilosis. *A. variegatum* is the vector of pathogenic bacteria such as *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp.; and protozoa such as *Theileria* spp. (Uilenberg *et al.*, 1983; Camus and Barré, 1992; Parola *et al.*, 1999; Loftis *et al.*, 2016). In 1986, the economic importance of *A. variegatum* and associated animal diseases in the Lesser Antilles was estimated to be US \$4.6 million per year (Camus and Barre, 1995). The tropical bont tick is still widespread within the Caribbean despite eradication attempts conducted in the English Lesser Antilles (Pegram *et al* 2004).

*Amblyomma cajennense*, the Cayenne tick, is a three-host tick parasitizing a wide range of hosts, including humans (Estrada-Peña *et al* 2004). Widely distributed throughout the Neotropical area of the Americas, *A. cajennense* is the second-most economically important tick species in South America (Camus and Barré, 1995). However, within the Caribbean, the distribution of *A. cajennense* seems to be restricted to Cuba, Jamaica, and Trinidad, where they are suspected to transmit *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp., and equine piroplasms (Estrada-Peña *et al* 2004; Scoles and Ueti, 2013).

*Rhipicephalus annulatus* shares *Rh. microplus*' ability to transmit both *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp. This tick can be mistaken for *Rh. microplus* due to their morphological similarities. Although some studies reported the presence of *Rh. annulatus* in the Caribbean, its prevalence is not well-characterised, nor its potential role as a TBD vector in the area (Morel, 1966; De la Cruz, 2001; Basu and Charles, 2017).

*Rhipicephalus sanguineus*, the brown dog tick, is a three-host tick widely distributed within the Caribbean and which commonly parasitizes dogs (Morel, 1966; De la Cruz, 2001;

Basu and Charles, 2017). *Rh. sanguineus* is an endophilic (adapted to indoor living) tick species, presenting threats to both human and animal health due to its ability to transmit *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*, and *Babesia* species (Danta-Torres, 2010).

*Dermacentor (Anocentor) nitens*, the tropical horse tick, is a one-host tick that mainly parasitizes equines (Da Silva Rodrigues *et al.*, 2017). *D. nitens* is suspected to be the vector of *Babesia caballi* and *Theileria equi*, the two causal agents of equine piroplasmosis (Asgarali *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015 b; Li *et al.*, 2015).

### ***Argasid tick vectors in the Caribbean***

Argasidae family taxonomy is still controversial due to extreme diversity and the absence of consensus guidelines for morphological identification. However, soft ticks do present numerous biological and ecological features that easily distinguish them from the Ixodidae. Argasid ticks do not possess a scutum, but a leathery integument, and their capitulum with mouthparts originating from the ventral face (Estrada-Peña, 2015). Generally, the parasitic stages feed on the host for several times over a short period (minutes to hours), ingesting a relatively small amount of blood per meal, and then go back to their nest (Jongejan and Uilenberg, 2004). It was thought that soft ticks have high host specificity, however, it has now been suggested that most soft ticks actually demonstrate indiscriminate host feeding. Such apparent variation in host preference probably reflects microhabitat preference and host availability within each microhabitat (Vial, 2009). Indeed Argasidae are typically defined by their endophilous behavior. Some species are endophilous nidicoles, adapted to living in their microhabitats by colonizing the nests and burrows of their hosts, and others are geophilous nidicoles, preferring locations near host habitations (Vial, 2009). Soft ticks mainly harbor tick-borne viruses, such as Hughes and Soldado virus, and some bacteria, such as *Borrelia* spp. responsible for human and animal disease (Labuda and Nuttall, 2004; Manzano-Román *et al.*, 2012). Reports of African swine fever virus during outbreaks in Cuba and Hispaniola (Haiti and Dominican Republic) (Table 1) were suspected to be transmitted by *Ornithodoros* spp. (Penrith, 2009). However, data on the diversity of soft ticks and associated pathogens in the Caribbean are scarce.

### **TBPs and TBDs reported within the Caribbean**

TBPs affecting human and animal health in the West Indies include bacteria (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp., *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp., *Coxiella* spp.), protozoa (*Babesia* spp., *Theileria* spp., and *Hepatozoon* spp.), and

arboviruses (African swine fever virus, Soldado virus, Hughes Virus, Wad Medani Virus, and Estero Real Virus). An overview of the current and historical distribution of these pathogens within the Caribbean region is presented in Figure 1 and Table 1.

### ***The main economically important TBPs in the Caribbean***

Due to their economic impact, six major animal TBPs are actively monitored in the Caribbean: *Anaplasma marginale*, *Ehrlichia ruminantium*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Babesia caballi*, and *Theileria equi*.

*A. marginale*, *E. ruminantium*, *B. bovis*, and *B. bigemina* are mainly cattle pathogens that can cause significant economic losses in both dairy and beef industries (Camus and Barre, 1995). TBDs induced by these pathogens are listed by the World Organisation of Animal Health (WOAH) as notifiable diseases (<sup>1</sup>). In addition to the direct impact on cattle health, the endemicity of these pathogens is a substantial hindrance to livestock development in the Caribbean. In particular, introducing high-productive breeds into the region is risky due to their increased susceptibility to TBPs compared to the more resistant, but less productive, local creole cattle. Most of the recorded clinical TBD cases have occurred in imported animals, mainly dairy cattle (Camus and Montenegro-James, 1994; Allsopp 2015).

*A. marginale*, responsible for bovine anaplasmosis, is mechanically transmitted by biting flies or blood-contaminated fomites, or biologically by ticks, according to the strain (Kocan *et al.*, 2010). Within the Caribbean, *Rh. microplus* ticks are considered as vector of *A. marginale*. It has been experimentally demonstrated that *Rh. microplus* can transstadially and intrastadially transmit this bacterium (Connell and Hall, 1972). However the importance of those phenomenons under natural conditions need to be explored, as *Rh. microplus* are one-host tick, meaning that most of the specimens spend their life on the same host (Connell and Hall, 1972; Alonso *et al.*, 1992 Aguirre *et al.*, 1994; Futse *et al.*, 2003). *A. marginale* is endemic throughout most of the Caribbean islands, with seroprevalence rates in the Lesser Antilles ranging from 1% to 68% (Camus and Montenegro-James, 1994; Camus and Barre, 1995).

*B. bovis* and *B. bigemina*, both transmitted by *Rh. microplus*, are the causative agents of bovine babesiosis. *Rh. microplus* adult females acquire haemoparasites during blood meals from an infected host, and then transovarially transmit it to their offspring, leading to infected

---

<sup>1</sup> <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017>

larvae. Then, two different ways of transmission to a new host are observed according to the parasite species. *B. bovis* is transmitted by larvae, whereas *B. bigemina* is transmitted by nymph and to a lesser extent by adult ticks (Alonso *et al.*, 1992). Both *B. bovis* and *B. bigemina* parasites are endemic to the Caribbean islands, with seroprevalence rates within the Lesser Antilles ranging from 18% to 58%, and 22% to 69%, respectively (Camus and Montenegro-James, 1994; Camus and Barre, 1995; Urdaz-Rodríguez *et al.*, 2009).

*E. ruminantium* (formerly *Rickettsia ruminantium* or *Cowdria ruminantium*) is responsible of bovine ehrlichiosis, commonly called cowdriosis or heartwater. Bovine ehrlichiosis is fatal to cattle, sheep, goats, and some wild ruminants, and is transmitted by *A. variegatum* in the West Indies (Camus and Barre, 1992). Ticks mainly transmit *E. ruminantium* transstadially, thus larvae or nymphs must acquire infections before they can transmit this bacterium to subsequent nymphal or adult stages (Bezuidenhout, 1987). Transovarial transmission and intrastadial transmission have been reported by female and male *A. hebreum* respectively, however, none of those phenomena have been recorded in *A. variegatum* (Bezuidenhout and Jacobsz 1986; Andrew and Norval, 1989; Allsopp, 2015). Heartwater is endemic to the islands of Guadeloupe, Marie-Galante, and Antigua. Between 2003 and 2005, *E. ruminantium* prevalence in *A. variegatum* ticks reached 37% in Guadeloupe, 36% in Marie-Galante, and 6% in Antigua (Vachiery *et al.*, 2008). Serological evidence for this pathogen was reported in Martinique and Montserrat in asymptomatic sheep, but results suggested potential cross reactions with closely-related *Ehrlichia* spp. (Camus and Barre, 1995; Zhang *et al.*, 2015a). Although *E. ruminantium* currently seems to be restricted to three islands, the wide distribution of the *A. variegatum* vector throughout the West Indies indicates that the risk of pathogen establishment in current *E. ruminantium*-free areas remains (Kelly *et al.*, 2011; Allsopp 2015).

Finally, *T. equi* (formerly *Piroplasma equi*, *Nuttalia equi*, or *Babesia equi*) and *B. caballi* (formerly *Piroplasma caballi*) both induce equine piroplasmosis. This TBD is also listed as notifiable by the WOA and is heavily monitored during horse importation into free-status countries. The introduction of asymptomatic infected carriers in disease-free areas where competent tick vectors are present, can lead to the spread of piroplasms to susceptible animals, and would lead to significant economic losses for the horse racing industry (Asgarali *et al.*, 2007; Wise *et al.*, 2013). Multiple ixodid ticks are suspected to be vectors of piroplasmosis, such as *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, and *Amblyomma* spp.. Experimental and natural data are however needed to confirm the role of these ticks in equine piroplasmosis epidemiology (Wise *et al.*, 2013). The principal tick species suspected to be

responsible for parasite transmission within the Caribbean is the one-host tick *D. nitens*. Generally, *B. caballi* is transstadially and transovarially transmitted in ticks which remain as infection reservoirs. *T. equi* parasites are transstadially or intrastadially maintained in ticks, such that nymphs and adult ticks can then transmit this pathogen to their hosts (Uilenberg, 2006; Scoles and Ueti, 2013). Even if these two parasites are considered endemic in most countries with tropical and subtropical climates, data concerning their importance and epidemiology within the Caribbean is limited. A previous study in Trinidad reported seroprevalences of 33.3% for *T. equi* and 68.8% for *B. caballi* (Asgarali *et al.*, 2007). Two other studies detected *T. equi* in Nevis, Dominica, and St Kitts, and *B. caballi* in Grenada, Monserrat, and St Kitts, in several ruminants species using molecular tools (Zhang *et al.*, 2015b ; Li *et al.*, 2015).

#### ***Other TBPs reported in the Caribbean***

Canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis* has been reported within the Caribbean and is associated with the tick vector *Rh. sanguineus*. Frequently considered as a canid pathogen, *E. canis* has also been suspected to cause human disease in Venezuela, suggesting a potential zoonosis risk (Perez *et al.*, 2006; Starkey *et al.*, 2016).

*E. canis* or other closely related species have been detected by *Ehrlichia* FRET-qPCR and by sequencing portions of the 16SrRNA and *glfA* genes in ruminant blood samples from four Caribbean islands (Zhang *et al* 2015a). The highly conservative nature of the genes targeted for the assay can not allow the identification of the *Ehrlichia* species occurring in those samples. However, those results may suggest that (1) if *E.canis* is present in those samples, thus this bacterium usually infecting dog can be able to infect a broader host range, including ruminants (2) if it is not *E. canis*, thus a new closely related *Ehrlichia* species can be present in the Caribbean, infecting ruminants (Zhang *et al* 2015a). In addition, *Ehrlichia minasensis* (*E. mineirensis*), a new cattle pathogen closely related to *E. canis*, has been detected in *Rh. microplus* ticks, in cattle from the Americas (Canada and Brazil), and from Tahiti, French Polynesia (Aguiar *et al.*, 2014; Cabezas-Cruz *et al.*, 2016; Laroche *et al.*, 2016). Further studies should address whether *E. minasensis* is also present in the Caribbean and if it is responsible for the *Ehrlichia* spp.-positive samples previously described.

In the USA, *Panola Mountain Ehrlichia* sp. (PME) is a recently described human pathogen mainly transmitted by *A. americanum*, and which is circulating in ruminant populations (Reeves *et al.*, 2008). PME, which is closely related to *E. ruminantium*, has been detected in *A. variegatum* collected on livestock from Dominica and St Kitts (Loftis *et al.*,

2016). Further studies on the vector competence of *A. variegatum* in PME transmission are needed, however this study suggests that this pathogen circulates in the livestock and tick populations on those two islands. As *A. variegatum* can feed on humans, PME's zoonotic risk should be evaluated (Loftis *et al.*, 2016).

*Anaplasma platys* is a dog pathogen responsible for canine cyclic thrombocytopenia, commonly transmitted by *Rh. sanguineus* and is reported in Caribbean dog populations (Starkey *et al.*, 2016). Typically considered as a canid pathogen, *A. platys* is also suspected to be responsible for human disease in Venezuela. Blood samples from two patients exposed to *Rh. sanguineus* and presenting nonspecific clinical signs (headaches and muscle pains), tested positive for *A. platys*, and intra-platelet inclusion bodies consistent with this pathogen were also observed (Arraga-Alvarado *et al.*, 2014). These results suggest a potential risk of zoonosis (Arraga-Alvarado *et al.*, 2014; Starkey *et al.*, 2016). The occurrence of tick-transmitted canine pathogens that also appear to be zoonotic, suggests that there are potential sanitary risks associated with stray dog populations, which are largely distributed throughout the Caribbean islands. Stray dogs could therefore be involved in TBP epidemiology, potentially acting as synanthropic infectious reservoirs, creating potential risks for human populations and domestic animals (Qablan *et al.*, 2012). The zoonotic potential of these pathogens highlights the need for increased awareness and communication with medical community.

*Anaplasma phagocytophilum* is a well-characterised human and animal pathogen in the Northern Hemisphere, and induces granulocytic anaplasmosis. This pathogen is usually transmitted by hard ticks of the *Ixodes persulcatus* complex and infects a large range of hosts worldwide. While *A. phagocytophilum* is linked to human granulocytic anaplasmosis in the USA, in Europe it is mainly associated with tick-borne fever in ruminants (Dugat *et al.*, 2015). Detection of antibodies to *A. phagocytophilum* in canine sera was reported in Puerto Rico and Grenada (Yabsley *et al.*, 2008; McCown *et al.*, 2013). However, the low specificity serological assay combined with the lack of knowledge on *Ixodes* spp. distributed in the Caribbean (reported in Puerto Rico but not in Grenada) suggest that those positive results were likely due to non-specific cross-reactions with *A. platys* (Yabsley *et al.*, 2008; McCown *et al.*, 2013).

*Rickettsia africae* belongs to the spotted fever group of the genus *Rickettsia* and is the etiologic agent causing African tick bite fever. In the Caribbean, *R. africae* is transmitted by *A. variegatum* (Parola *et al.*, 1999). Despite high levels of tick infection and a seroprevalence ranging from 7% to 62% in human and animal sera, only one human case of African tick bite

fever has been officially reported in a French tourist travelling in Guadeloupe (Parola *et al.*, 1998; 1999; Robinson *et al.*, 2009; Kelly *et al.*, 2003; 2010a).

*Rickettsia conorii*, another spotted fever group pathogen, is the etiological agent of Mediterranean spotted fever and has also been reported in the area, but the actual occurrence of this pathogen is uncertain, as non-specific serological tests were used (Morel, 1967; Parola *et al.*, 1999).

Although some *Rickettsia* are usually transmitted by fleas or lice, ticks are also suspected to be involved in their epidemiology, such as for *Rickettsia felis* and *Rickettsia typhi*, both only detected once in the Carribean (Tamsitt and Valdivieso, 1970; Kelly *et al.*, 2010b).

Lyme disease is a borreliosis caused by a complex of ~18 genospecies of spirochete known collectively as *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), and is the most common vector-borne disease affecting humans in the Northern Hemisphere. The life cycle of these pathogens is especially complex, involves numerous vertebrate hosts, and are only known to be transmitted by *Ixodes* spp." (Schotthoefer and Frost, 2015). Whether *B. burgdorferi* sensu lato spirochetes circulates within the Carribean, where typical vector ticks are absent, is a controversial topic. *B. burgdorferi* sensu stricto antibodies were detected in human serum in Cuba, associated with clinical cases of Lyme disease-like syndrome (Rodriguez *et al.*, 2004; 2012). However, Dessau and colleagues (2012), clearly reject the interpretation of the serological assay used to detect antibodies to spirochetes in the Cuban study, and instead consider that the positive results are more likely serological background noise. Moreover, the observation of erythema migrans-like skin lesions are not pathognomonic for Lyme disease diagnosis, and does not in itself prove the presence of spirochetes (Sharma *et al.*, 2010; Lantos *et al.*, 2013). Further studies, especially those isolating spirochetes, should be performed to elucidate whether *B. burgdorferi* sensu lato spirochetes circulates within the Carribean.

Relapsing fever group *Borrelia* spp." have been reported in the US Virgin Islands, with the detection of antibodies to *Borrelia hermsii*, or a closely related *Borrelia* species, in association with a human case of relapsing fever. Relapsing fever group *Borrelia* spp. are usually transmitted by soft ticks, suggesting the presence of *Ornithodoros* species on the island, the disease case was declared autochthonous (Flanigan *et al.*, 1991). Given the significant medical and economical impact of relapsing fever, further studies are required to identify spirochetes and their potential tick vectors circulating in the West Indies.

*Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii*, is a recent human and dog pathogen, and is mainly responsible for vascular and neurological infections (Breitschwerdt *et al.*, 2010). This pathogen has been reported in Caribbean dog populations (Yabsley *et al.*, 2008). The way of transmission of this pathogen is not know, but dog's ectoparasites such as tick and fleas are suspected to play a role as vectors. Indeed, the fact that *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* infections in dogs are associated with tick infestations and with other TBPs co-infections suggest that tick may be able to transmit it (Billeter *et al* 2008; Yabsley *et al.*, 2008). As *Rh. sanguineus* is the main dog associated tick species occurring in the Caribbean, its vector competence for *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* need to be investigate. Even if Billeter *et al.*, 2012 demonstrated the experimental failure of transovarial transmission of this bacterium by *Rh. sanguineus*, other ways of tick-assisted transmission remain to be explored (Billeter *et al.*, 2008; 2012; Yabsley *et al.*, 2008).

*Coxiella burnetii* (formerly *Rickettsia burnetii*) is a small obligate intracellular gram-negative bacterium producing Q fever, a human disease occurring worldwide. Q fever is considered to be an airborne zoonotic disease, mainly transmitted through contaminated aerosols such as barnyard dust contaminated by dried placental material, birth fluids, and excreta of infected animals. However ticks such as *Rh. microplus* or *Rh. sanguineus* are also suspected to be involved in Q fever epidemiology as potential vectors (Duron *et al.*, 2015). Little is known about *C. burnetii* distribution within the Caribbean, and only one older reference reported its detection in Puerto Rican cattle (Tamsitt and Valdivieso, 1970).

*Mycoplasma haemocanis* and *Candidatus* M. haematoparvum, responsible for canine mycoplasmosis, have been reported in the Caribbean. Both pathogens are suspected to be transmitted by *Rh. sanguineus* (Barker *et al.*, 2010). Mycoplasmosis is not considered to be a TBD, but some hemotrophic mycoplasmas of veterinary and public health importance are occasionally detected in ticks, and in co-infections with known TBPs in affected hosts. Ticks are therefore suspected to play a role in the epidemiology of these bacteria (Barker *et al.*, 2010). Feline hemoplasma, *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus* Mycoplasma haemominutum, have been reported in cats with severe anemia in Trinidad (Georges *et al.*, 2008). In addition, *Mycoplasma wenyonii* and *Mycoplasma ovis*, infecting cattle and sheep respectively, have been reported in Cuba (Rodriguez *et al.*, 1989a; 1989b). However, tick involvement in pathogen epidemiology is unknown.

*Babesia canis vogeli* and *Babesia gibsoni* are transmitted by *Rh. sanguineus*. Both protozoan parasites cause canine babesiosis. Although these parasites are usually associated with dogs, pathogen DNA has been detected in unusual vertebrate hosts such as cats, cattle,



goats, sheep, and donkeys in the Caribbean, suggesting a larger host range than previously thought (Georges *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2015). Cattle parasitized by *Rh. sanguineus* have not been reported in the Caribbean, suggesting the presence of another vector. *Rhipicephalus turanicus* is a tick species that is difficult to differentiate from *Rh. sanguineus*, and has been put forward as a potential vector for *B. canis vogeli*. No reports of *Rh. turanicus* in the West Indies exist, but since *Rh. turanicus* can parasitize a broader range of hosts, including cattle, its potential presence in the area needs further investigation (Li *et al.*, 2015).

*Babesia canis rossi* and *Babesia vulpes* are other canid pathogens that have also been detected in small ruminants in Montserrat and Dominica (Zhang *et al.*, 2015b; Li *et al.* 2015). Usually, these two pathogens circulate in the Northern Hemisphere in parallel with the *Haemaphysalis* spp. tick vector. The detection of *B. canis rossi* and *B. vulpes* in small ruminants where there is no record of known tick vector, deserves further epidemiological investigation to understand their potential circulation in the West Indies (Li *et al.* 2015).

Bovine theileriosis has rarely been reported in the Caribbean, and infections are typically asymptomatic in domestic and wild ruminants. *Theileria mutans* and *Theileria velifera* have been reported in Caribbean cattle, and are transmitted by *A. variegatum* (Uilenberg *et al.*, 1983; Alonso *et al.*, 1992). One report described *Theileria parva* infection in Guadeloupe, but the study suggested that *T. mutans* was misidentified (Morel, 1967). New species of unknown pathogenicity have been recently detected, including *Theileria* sp. NG-2013a, *Theileria* sp. OT3, *Theileria* sp. YW-2014, and *Theileria* sp. B15a, in various domesticated Caribbean animals (Zhang *et al.*, 2015 a). Further studies are needed to identify potential tick vectors and hosts and to determine their potential pathogenicity (Zhang *et al.*, 2015b).

*Hepatozoon canis* is a haemoprotozoan parasite infecting dogs, and is usually transmitted by ingesting infected *Rh. sanguineus* ticks (Starkey *et al.*, 2016). *H. canis* have been reported in dogs from Aruba, Grenada, Haiti, St Kitts, and Trinidad (Sant *et al.*, 2017).

African swine fever virus (ASFV) causes severe haemorrhagic disease in domestic pigs, and can be transmitted by direct contact or by *Ornithodoros* tick bites. ASFV outbreaks have occurred in Cuba, Haiti, and the Dominican Republic in the 1970s, where *Ornithodoros* species, such as *O. coriaceus*, *O. parkeri*, *O. turicata*, and *O. puertoricensis*, were suspected as vectors (Butler and Gibbs, 1984; Penrith, 2009). However, ASFV has been since eradicated from the region.

Several arboviruses of unknown pathogenicity have been described in the Caribbean region. Arboviruses described within the West Indies are mainly associated with seabird

colonies and their ticks (Table 1). Birds are implicated in tick dispersion, suggesting potential viral dissemination risks and highlighting the need for further epidemiological and pathogenicity studies (Labuda and Nuttall, 2004). As the majority of studies surveying TBPs worldwide have focused on bacterial and/or protozoal pathogens, tick-borne virus diversity is poorly understood (Labuda and Nuttall, 2004; Moutailler *et al.*, 2016b).

## **New insights for tick-borne disease epidemiology and control in the West Indies**

### ***Challenges of TBD management in the Caribbean***

The management and prevention of TBDs are included within the “*One Health*” global health strategy, although they are still overlooked by other major zoonotic diseases such as rabies, avian influenza, etc... (Gebreyes *et al.*, 2014; Dantas-Torres *et al.*, 2012). The “*One Health*” concept describes a comprehensive health crisis management and prevention approach that encompasses human, animal, and ecosystem health (Gebreyes *et al.*, 2014; Day, 2011). Applying the “*One Health*” approach to TBDs mainly relies on the implementation of enhanced cross-sector communication and the development of technical expertise (Dantas-Torres *et al.*, 2012; Baneth, 2014). In addition to the emergence of animal and zoonotic infectious diseases in the Caribbean and their resulting significant economic impact, many of these islands must cope with limited resources and few available experts, thus preventing standardized and coordinated TBD management and control <sup>(2)</sup>. However, health networks <sup>(3)</sup> have recently been developed in the Caribbean, as an effort to improve the situation. CaribVET <sup>(4)</sup> is one of the most developed networks, dealing with animal health and bringing together 45 partners, including the veterinary services of 34 Caribbean and American countries/territories, and international research and health organizations such as UWI Jamaica-Barbados-Trinidad and Tobago, CENSA Cuba, CIRAD Guadeloupe, FAO, and PAHO. CaribVET recently launched a “*One Health*” project to identify a wide range of TBPs affecting both humans and animals across eight Caribbean islands. The results of this study will certainly contribute valuable new information about the current distribution of Caribbean TBDs, and help decision-makers with their risk evaluation and management. Even if such initiatives are carried out and improve overall Caribbean health, progress will always be hampered by the highly contrasting circumstances throughout the region. Such situations

---

<sup>2</sup> <https://www.onehealthcaribbean.org/index.php/aboutus/one-health-one-caribbean-one-love-project>

<sup>3</sup> [http://www.who.int/tdr/news/2016/VBD\\_networks\\_collab\\_centres.pdf](http://www.who.int/tdr/news/2016/VBD_networks_collab_centres.pdf)

<sup>4</sup> <https://www.caribvet.net/>

include heterogeneous countries and territories defined by different cultures, demographics, politics, socio-economics, landscapes, and various animal production systems and disease priorities that do not facilitate the implementation of a “*One Health*” TBD management strategy <sup>(2)</sup>. Indeed, technical, administrative, and socio-economic weaknesses have contributed to the delay and have thwarted large tick eradication programs against *A. variegatum* and *Rh. microplus* within the Caribbean (Crom, 1992; Pegram *et al.*, 2000, 2007). In addition, methods commonly used for tick control are generally based on intensive chemical approaches. The use of acaricides requires frequent and regular treatments which are costly, and contamination of meat, milk, and the environment with chemical residues, and acaricide resistance is a reality. Thus the development of anti-tick vaccines is a promising alternative for tick control (Rodriguez-Mallon, 2016). Since the 90s, anti-tick vaccines have been developed targeting the Bm86 glycoprotein of *Rh. microplus*. The GAVAC and TickGARD vaccines were developed in Cuba and Australia, respectively (de la Fuente, 2007). In Cuba, field trials demonstrated that GAVAC vaccination associated with integrated tick control strategies can reduce *Rhipicephalus* spp. infestation, the frequency of required acaricide treatments, and the incidence of babesiosis and anaplasmosis (Valle *et al.*, 2004; de la Fuente, 2007).

Thus, to develop efficient tick control programs and prevention strategies in the Caribbean, the following crucial barriers must be overcome: (1) improving epidemiological knowledge on interactions between tick species, circulating pathogens, associated vertebrate hosts including humans and animals, and their environment; (2) development of effective detection and diagnostic tools vital to improving TBD surveillance capacity; and (3) improvement of global communication between all involved sectors, including researchers, physicians, veterinarians, and governmental services, from local to international levels (Dantas-Torres *et al.*, 2012). Successful TBD management will depend on a unified and standardized vision of Caribbean health which necessarily relies on existing health networks such as the CaribVET and the Caribbean Vector-Borne Diseases Network (CariVecNet), with technical and financial support from international bodies.

### ***Tick and TBD epidemiology in the next-generation sequencing era***

The extent of tick infestations and the pathogens they can transmit to humans and animals in the Caribbean region is poorly characterized due to a clear lack of actual epidemiological data.

Most of the TBPs reported here have been detected by standard serological or molecular tools (Table 1). However, the majority of the serological TBP assays available in the Caribbean are archaic with likely non-specific cross-reactions, leading to potential pathogen mis-identification and incorrect epidemiological conclusions. For example, the detection of serum antibodies to *A. phagocytophilum* (a zoonotic pathogen responsible for granulocytic anaplasmosis) in Puerto Rican dogs was likely due to non-specific cross-reaction with *A. platys* (Yabsley *et al.*, 2008; McCown *et al.*, 2013). Similar conclusions have been applied to records of serological detection of *R. conorii* in Guadeloupe, which was likely confused with non-specific *R. africae* cross-reactions (Morel, 1967; Parola *et al.*, 1999). Advances in molecular biology since the late 80s, including the use of conventional PCR or real-time PCR, have overcome the specificity and sensitivity limits of serological assays. Moreover, these technologies enable the detection of pathogens in vector ticks. As a result of this technology, the list of potential TBPs is rapidly increasing worldwide, where new potential tick vectors and host associations are continually being described (Estrada-Peña *et al.*, 2013). For example, PCR assays enabled the first detection of PME in *A. variegatum* ticks in St Kitts and Dominica, suggesting that the range of tick vectors can be extended further than previously thought (Loftis *et al.*, 2016). Additionally, the recently-developed generic oligonucleotide FRET-qPCR enables the detection of unexpected pathogen species in cattle, such as *B. gibsoni* and *B. canis vogeli*, and the detection of uncharacterized species, such as *Ehrlichia* spp., which is closely related to *E. canis* bacteria (Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015 a and b). However, pathogen surveillance using these approaches is still limited to the detection of a small set of given pathogens (Estrada-Peña *et al.*, 2013).

Innovative next-generation sequencing (NGS) techniques, combined with bioinformatic analyses enable the construction of a wide and without *a priori* inventory of tick-borne microorganisms, boosting the epidemiology and diagnosis of infectious diseases such as TBDs (Carpi *et al.*, 2011). Several second-generation sequencing (SGS) methodologies are now available (Mardis, 2008; Liu *et al.*, 2012), and some have been used to explore the complexity of bacterial communities within ticks. 16S rRNA tag-encoded amplicon pyrosequencing, Illumina, or 454 pyrosequencing have also been used to describe the structure and diversity of bacterial communities in *Rh. microplus* and *I. ricinus* ticks (Andreotti *et al.*, 2011; Carpi *et al.*, 2011). The main bacterial taxa were characterized, but due to the sequencing approach used, microorganisms were not as easily identified at the species level. The choice of methodology used must relate to the epidemiological purpose of the study, especially if distinction between endosymbiotic and pathogenic bacteria belonging

to the same genera is required (Carpi *et al.*, 2011). In addition to pathogen surveillance, NGS technologies now provide opportunities to characterize the tick microbiome. Microbiomes include all the commensal, symbiotic, and pathogenic microorganisms that interact both with each other and the tick, and which likely have a strong impact on tick biology and pathogen transmission ability (reviewed by Narasimhan and Fikrig 2015). Deciphering tick microbiome complexity and function could be a key stepping-stone in the development of new TBD control strategies (Narasimhan and Fikrig, 2015). In addition to genomics, RNA high-throughput sequencing technologies have also been used to characterize the *I. ricinus* transcriptome, facilitating the identification of replicative tick-borne microorganisms as well as the simultaneous analysis of bacteria, parasites, and viruses (Vayssier-Taussat *et al.*, 2013; Bonnet *et al.*, 2014, Moutailler *et al.*, 2016b). These analyses demonstrate the capacity of RNAseq technology to characterize the vast diversity of the tick microbiome, and to detect known but also new and unsuspected pathogens (Vayssier-Taussat *et al.*, 2013; 2015; Bonnet *et al.*, 2014, Moutailler *et al.*, 2016b). Despite the high-throughput capacity of NGS, a large portion of the generated data is unable to be analyzed, and the frequently short read length sometimes hinders *de novo* genome assembly and sequence analysis, especially in relation to species level microorganism identification. Moreover, NGS data is based on conventional homology-based sequence searches, and thus requires specific references. Current genomic reference databases are lacking in accuracy and richness, leading to a significant number of unassigned sequences. As this “black box” may include sequences of new or poorly characterized microorganisms, bioinformatic tools need to be developed in order to overcome such limitations. For example, the recently-developed Batch Learning Self-organizing Maps (BLSOMs) approach has enabled the characterization of bacterial communities from several tick species without the need for taxonomic reference information (Nakao *et al.*, 2013).

Third-generation sequencing (TGS) technologies are now available. Contrary to the sequencing methods described above, TGS technologies, such as Pacbio and MinION, directly target single DNA molecules, enabling real-time sequencing, with long reads ready for analysis immediately after sequencing (Rhoads and Au, 2015; Lu *et al.*, 2016). These innovative technologies offer new opportunities in pathogen surveillance and clinical diagnostic applications. Moreover, the MinION device, with its small size and low cost, can be easily transported into the field during disease outbreaks, greatly aiding real-time pathogen monitoring (Lu *et al.*, 2016). For example, MinION technology was used to sequence Zika virus from clinical samples during the 2016 South-American Zika outbreak (Quick *et al.*, 2017; Faria *et al.*, 2017). Table 2 compares the general features and applications of the main

sequencing platforms (the three generations). Finally, the recent development of such high-throughput detection technologies now provides an unprecedented level of rapid and simultaneous tracking of a wide range of pathogens of sanitary importance in tick samples. Combined with the high-throughput sequencing technologies described above, these powerful investigation methods represent a major improvement in TBP and TBD epidemiology and health surveillance. Recently, a high-throughput real-time microfluidic PCR was developed for large and rapid screening of TBPs within European ticks. This detection tool can simultaneously monitor the circulation of 25 bacterial and 12 protozoan species within 94 tick samples (Michelet *et al.*, 2014). Beside the high detection yield, this method is also time and cost saving. Two size of support for microfluidic PCRs are available, a 96.96 chip and a 48.48 chip, which perform in one run 9216 and 2304 real-time PCR reactions respectively. Experiment leading with the 96.96 dynamic array (48.48), take around four hours (three hours), and the cost per reaction is around \$9.1 (\$5.5) from tick homogenates to real-time PCR results (Michelet *et al.*, 2014). Such analyses not only provide a rapid overview of pathogen prevalences in field tick samples, but are also able to detect co-infection. Pathogen co-infections, or symbiotic-pathogen associations, play a crucial role in TBD epidemiology. Symbiotic bacteria can affect the vector competence of the tick, and pathogen co-infection can enhance disease severity as well as affecting diagnosis and treatment capacity (Moutailler *et al.*, 2016a; Diuk-Wasser *et al* 2016). High-throughput technologies thus represent a major improvement in surveillance methods, suitable for large-scale epidemiological studies, and which can be easily adapted for the monitoring of emerging pathogens from different areas of the world, such as the Caribbean. However, the increased performance of these methods should not conceal the increased risk of epidemiological mis-interpretation of data on pathogen transmission by ticks. Indeed, DNA or RNA detection alone does not conclusively establish that ticks can transmit pathogens and thus cause disease. Ticks harvested directly from the host may have only sampled pathogens present in the host while they themselves remain resistant to the infection and are unable to transmit these pathogens to other susceptible hosts (Loftis *et al.*, 2016). Thus, the physiologic state of the tick (flat, partially fed, mated, engorged, etc...) should be clarified as it can influence the epidemiological meaning of TBPs detection studies (Loftis *et al.*, 2016). Finally, vector competence and the capacity of ticks to transmit an infectious agent, as well as natural evidence of infection are thus needed to prove tick involvement in a pathogen's life cycle (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

## ***Molecular biology technologies for tick taxonomy***

Accurately identifying the tick vector is essential in TBD epidemiological studies, however, tick taxonomy usually relies on morphological specimen identification. Precisely identifying morphological characteristics in ticks can be challenging, and requires expertise in acarology. Moreover, adequate morphological identification keys for all the tick species occurring in a given area, and more particularly for each developmental stage of a tick species, are not always available in the literature (Estrada-Peña *et al.*, 2013). In addition, during tick collection and storage in the field, samples can be damaged or limited to developmental stages such as larvae or nymphs, which are more difficult to identify than adults. Ticks collected in (sub)-tropical areas are often directly sampled from the host because trapping in the environment is cumbersome and at times unsuccessful. Those specimens collected from hosts are often engorged and deformed, thus making morphological determination more difficult (Zhang and Zhang, 2014). Under such circumstances, molecular tools can be useful in speciating ticks. DNA barcoding approaches have been successfully tested for tick molecular identification using reference databases. Owing to the consistency between morphological and molecular assignation for the majority of ticks, DNA barcoding is eminently suitable for taxonomy (Zhang and Zhang, 2014). MALDI-TOF mass spectrometry for tick identification could also become a promising alternative tool as it only requires a single tick leg for the process (Yssouf *et al.*, 2015). Therefore, the combined use of both morphological and molecular tick identification methods together is required to fully decipher the complexity of tick taxonomy. Finally, in regard to tick identification, the characterisation of the diversity of hosts involved in the bio-ecology of ticks through the analysis of the blood meal present in the tick midgut may provide further information on TBPs epidemiology. Briefly, such analyses consist in the detection of fragment of currently known hosts's conserved genes in tick by molecular assays followed by sequence analysis (Collini *et al.*, 2015). Identifying the diversity and the nature of the hosts used for the tick feeding may help to understand which animals are involved in tick life cycle and which can act as reservoir of pathogens (Estrada-Peña *et al.*, 2013; Collini *et al.*, 2015).

## **Conclusions**

We have reviewed the currently available epidemiological literature on ticks and TBPs circulating in the Caribbean. The majority of reported and monitored TBPs in the Caribbean are those concerning pets and livestock, however, many records are outdated and are based on underperforming serological assays. This situation highlights the need to update

epidemiological data concerning the diversity of TBPs circulating in the West Indies. Surprisingly, despite the widespread circulation of zoonotic TBPs, few human TBDs have been reported within the area. Most tick infestation reports in the West Indies have been associated with cattle and dogs. However, as the diagnosis of TBDs is challenging and requires a certain level of medical expertise and awareness, human infections might be under-reported in this region. In addition, several zoonotic TBPs infecting dogs represent potential zoonotic risks that should be addressed. The use of innovative technologies such as high-throughput pathogen sequencing and detection has opened unparalleled capacities to unravel the diversity of TBPs circulating in the area. In particular, high-throughput real-time microfluidic PCR is a powerful tool for the simultaneous detection of up to 96 different pathogens in up to 96 samples, using nano volumes of samples. Additional advantages of this nanotechnology are the reduced level of expertise and shorter time required for sample preparation and data analysis compared to high-throughput sequencing. The application of such technologies for pathogen detection in large-scale surveys is very likely to generate important contributions towards the epidemiology, prevention, and control of TBDs in the Caribbean.



654 **Table 1 Tick-borne pathogens and suspected tick vetors reported within the Caribbean**

655

Pathogens	Caribbean distribution	Infection (TBDs)	Vector *	Reported Host	Detection Method	Reference
<i>Anaplasma marginale</i>	Antigua, Barbados, Cuba, Dominica, Dominican Republic, Grenada, Guadeloupe, Haiti, Jamaica, Martinique, Montserrat, Puerto Rico, St Kitts and Nevis, St Lucia, St Martin, St Vincent, Trinidad	Anaplasmosis	<i>Rh. microplus</i>	Cattle	Serology	Camus and Montenegro-James, 1994; Camus and Barre., 1995;
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Puerto Rico	Anaplasmosis (Granulocytic Anaplasmosis)	<i>Ixodes</i> spp	Dogs	Serology	McCown <i>et al.</i> , 2013
<i>Anaplasma platys</i>	Cuba, Grenada, Haiti, St Kitts, Trinidad,	Anaplasmosis (Canine Cyclic Thrombocytopenia)	<i>Rh. sanguineus</i> , <i>A.cajennense</i>	Dogs	Serology / Molecular biology	Georges <i>et al.</i> , 2008; Yabsley <i>et al.</i> , 2008; Loftis <i>et al.</i> , 2013; Kelly <i>et al.</i> , 2013a; Bezerra da Silva <i>et al.</i> , 2016; Starkey <i>et al.</i> , 2016

<b><i>Bartonella vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i></b>	Grenada, Martinique	Canine and human endocarditis	<i>Rh.sanguineus</i>	Dogs	Serology / Molecular biology	Yabsley <i>et al.</i> , 2008; Boulouis <i>et al.</i> , 2005
<b><i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i></b>	Cuba	Borreliosis (Lyme disease)	<i>A.cajennense</i>	Humans	Serology	Rodriguez <i>et al.</i> , 2004; 2012
<b><i>Borrelia Relapsing Fever group (Borrelia hermsii)</i></b>	US Virgin Islands	Borreliosis (Relapsing fever)	<i>Ornithodoros</i> spp	Humans	Serology	Flanigan <i>et al.</i> , 1991
<b><i>Coxiella burnetii</i></b>	Puerto Rico	Q fever	<i>D. nitens</i>	Cattle	ND	Tamsitt and Valdivieso, 1970
<b><i>Ehrlichia canis</i></b>	Aruba, British West Indies, Grenada, Haiti, Puerto Rico , St Kitts and Nevis, Trinidad, Turks and Caicos Islands	Ehrlichiosis (Canine Monocytotic Ehrlichiosis)	<i>Rh. Sanguineus</i>	Canids, Cats	Serology / Molecular biology	Morel, 1967; Hoff <i>et al.</i> , 2008; Georges <i>et al.</i> , 2008; Yabsley <i>et al.</i> , 2008; Loftis <i>et al.</i> , 2013; McCown <i>et al.</i> , 2013; Starkey <i>et al.</i> , 2016
<b><i>Ehrlichia canis</i> or closely related species</b>	Dominica, Grenada, Montserrat, St Kitts and Nevis	Ehrlichiosis	ND	Cattle, Sheep, Goats	Molecular biology	Zhang <i>et al.</i> , 2015a
<b><i>Ehrlichia ruminatum</i></b>	Antigua, Guadeloupe, Marie Gualante	Ehrlichiosis (Heartwater, Cowdriosis)	<i>A. variegatum</i>	Cattle	Serology	Camus and Barre., 1995; Vachiery <i>et al.</i> , 2008; Kelly <i>et al.</i> , 2011
<b><i>Panola Mountain Ehrlichia</i> sp.</b>	Dominica, St Kitts	Ehrlichiosis	<i>A. variegatum</i>	Domestic animals	Molecular biology	Loftis <i>et al.</i> , 2016

<b><i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i></b>	Trinidad	Hemotropic mycoplasmosis	<i>Rh. sanguineus</i>	Dogs	Molecular biology	Barker <i>et al.</i> , 2010
<b><i>Mycoplasma haemocanis</i></b>	Trinidad	Hemotropic mycoplasmosis	<i>Rh. sanguineus</i>	Dogs	Molecular biology	Barker <i>et al.</i> , 2010
<b><i>Mycoplasma haemofelis</i></b>	Trinidad	Hemotropic mycoplasmosis	<i>Rh. sanguineus</i>	Cats	Molecular biology	Georges <i>et al.</i> , 2008
<b><i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i></b>	Trinidad	Hemotropic mycoplasmosis	<i>Rh. sanguineus</i>	Cats	Molecular biology	Georges <i>et al.</i> , 2008
<b><i>Mycoplasma wenyonii</i></b>	Cuba	Hemotropic mycoplasmosis	ND	Cattle	ND	Rodriguez <i>et al.</i> , 1989a
<b><i>Mycoplasma ovis</i></b>	Cuba	Hemotropic mycoplasmosis	ND	Sheep	Serology	Rodriguez <i>et al.</i> , 1989b
<b><i>Rickettsia africae</i></b>	Antigua, Dominica, Guadeloupe, Martinique, Montserrat, St Kitts and Nevis, St Lucia, U.S. Virgin Islands	Rickettsiosis (African tick bite fever)	<i>A. variegatum</i>	Humans, Cattle, Goats, Sheep	Serology / Molecular biology	Parola <i>et al.</i> , 1998; 1999; Parola and Barré, 2004; Robinson <i>et al.</i> , 2009; Kelly <i>et al.</i> , 2010a
<b><i>Rickettsia conorii</i></b>	Guadeloupe	Rickettsiosis (Mediterranean spotted fever)	<i>A. variegatum</i>	Humans	Serology	Morel, 1967
<b><i>Rickettsia felis</i></b>	Dominica, St Kitts	Rickettsiosis	<i>Ctenocephalides felis</i>	Cats	Molecular biology	Kelly <i>et al.</i> , 2010b
<b><i>Rickettsia typhi</i></b>	Puerto Rico	Rickettsiosis (Murine typhus)	<i>Xenopsylla cheopis</i>	Rodents	ND	Tamsitt and Valdivieso, 1970
<b><i>Babesia bigemina</i></b>	Antigua, Barbados, Cuba, Dominica,	Babesiosis	<i>Rh. microplus</i>	Cattle	Serology / Molecular biology	Camus and Montenegro-James, 1994;

	Dominican Republic, Grenada, Guadeloupe, Haiti, Jamaica, Martinique, Montserrat, Puerto Rico, St Kitts and Nevis, St Lucia, St Martin, St Vincent, Trinidad					Camus and Barre., 1995; Li <i>et al.</i> , 2015
<b><i>Babesia bovis</i></b>	Antigua, Barbados, Cuba, Dominica, Dominican Republic, Grenada, Guadeloupe, Haiti, Jamaica, Martinique, Montserrat, Puerto Rico, St Kitts and Nevis, St Lucia, St Martin, St Vincent, Trinidad	Babesiosis	<i>Rh. microplus</i>	Cattle	Serology / Molecular biology	Camus and Montenegro-James, 1994; Camus and Barre., 1995; Li <i>et al.</i> , 2015
<b><i>Babesia caballi</i></b>	Grenada, Guadeloupe, Martinique, Montserrat, St Kitts and Nevis,	Piroplasmosis	<i>D. nitens</i>	Equids, Goats, Sheep	Serology / Molecular biology	Morel, 1967; Asgarali <i>et al.</i> , 2007; Li <i>et al.</i> , 2015;

	Trinidad					
<b><i>Babesia (canis) rossi</i></b>	Montserrat	Babesiosis	<i>Rh. sanguineus</i> , <i>Rh. turanicus</i>	Goats	Molecular biology	Li <i>et al.</i> , 2015
<b><i>Babesia (canis) vogeli</i></b>	Dominica, Grenada, Haiti, Montserrat , St Kitts and Nevis, Trinidad	Babesiosis	<i>Rh. sanguineus</i> , <i>Rh. turanicus</i>	Dogs, Cats, Cattle, Sheep, Goats	Serology / Molecular biology	Georges <i>et al.</i> , 2008; Yabsley <i>et al.</i> , 2008; Kelly <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2015; Starkey <i>et al.</i> , 2016;
<b><i>Babesia gibsoni</i></b>	Dominica, St kitts	Babesiosis	<i>Rh. sanguineus</i> , <i>Rh. turanicus</i>	Dogs, Cattle, Sheep, Goat, Equids	Molecular biology	Kelly <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2015
<b><i>Babesia vulpes</i></b>	Montserrat	Babesiosis	ND	Goats, Sheep	Molecular biology	Zhang <i>et al.</i> , 2015b
<b><i>Hepatozoon canis</i></b>	Aruba, Grenada, Haiti, St Kitts, Trinidad	Hepatozoonosis	<i>Rh. sanguineus</i>	Dogs	Serology/Molecular biology	Yabsley <i>et al.</i> , 2008; Kelly <i>et al.</i> , 2013; Starkey <i>et al.</i> , 2016; Sant <i>et al.</i> , 2017
<b><i>Theileria equi</i></b>	Dominica, St kitts and Nevis, Trinidad	Piroplasmosis	<i>D. nitens</i>	Equids, Cattle, Sheep, Goats	Serology/Molecular biology	Asgarali <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2015b
<b><i>Theileria mutans</i></b>	Cuba, Guadeloupe, Martinique	Theileriosis	<i>A. variegatum</i>	Cattle	Serology (IFA)	Uilenberg <i>et al.</i> , 1983; Alonso <i>et al.</i> , 1992; Rodríguez <i>et al.</i> , 1989b
<b><i>Theileria parva</i></b>	Guadeloupe	Theileriosis	<i>A. variegatum</i>	Cattle	ND	Morel, 1967
<b><i>Theileria sp. B15a</i></b>	Grenada	Theileriosis	ND	Cattle	Molecular biology	Zhang <i>et al.</i> , 2015b
<b><i>Theileria sp. NG-2013a</i></b>	Nevis	Theileriosis	ND	Goats	Molecular biology	Zhang <i>et al.</i> , 2015b

<b><i>Theileria</i> sp. OT3</b>	Montserrat	Theileriosis	ND	Sheep, Goats	Molecular biology	Zhang <i>et al.</i> , 2015b
<b><i>Theileria</i> sp. YW-2014</b>	St Kitts	Theileriosis	ND	Equids	Molecular biology	Zhang <i>et al.</i> , 2015b
<b><i>Theileri velifera</i></b>	Guadeloupe	Theileriosis	<i>A. variegatum</i>	Cattle	Serology	Uilenberg <i>et al.</i> , 1983
<b>African swine fever</b>	Cuba, Dominican Republic, Haiti	African swine fever	<i>Ornithodoros</i> spp	Swine	ND	Butler and Gibbs, 1984; Penrith, 2009
<b>Estero Real</b>	Cuba	ND	<i>C. tadaridae</i>	ND	Isolation	Malkova <i>et al.</i> , 1985
<b>Hugues Virus</b>	Cuba, Trinidad	ND	<i>C. denmarki</i>	Seabirds	Isolation	Aitken, 1968; Danielová <i>et al.</i> , 1982
<b>Soldado Virus</b>	Trinidad	ND	<i>Carios</i> spp	Seabirds	Isolation	Jonkers <i>et al.</i> , 1973
<b>Wad Medani Virus</b>	Jamaica	ND	<i>A.cajennense</i>	ND	Isolation	Belle <i>et al.</i> , 1980

\*Suspected or characterized tick vector.

665

666 **Table 2 : Performance comparison of sequencing platforms of the first, second and third generation (G) of sequencing.** Informations  
 667 obtained from Liu et al., 2012 ; Rhoads *et al.* (2015) ; Lu et al., 2016 ; and from the different furnisher (F) web site : (1) Thermo Fisher  
 668 Scientific, Sanger / Ion Torrent™ / SOLiD™ : [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com) ; (2) Roche (454 Life science) : [http://allseq.com/knowledge-](http://allseq.com/knowledge-bank/sequencing-platforms/454-roche/)  
 669 [bank/sequencing-platforms/454-roche/](http://allseq.com/knowledge-bank/sequencing-platforms/454-roche/) ; (3) Illumina: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html> ; (4) Pacific Biosciences :  
 670 <http://www.pacb.com/products-and-services/pacbio-systems/> ; (5) Oxford Nanopore Technologies :  
 671 <https://nanoporetech.com/index.php/products#comparison>

672

F	G	Instrument	Sequencing technology	Maximum Read length	Accuracy	Maximum Reads /Run	Time /Run	Intrument / and Run price (\$)	Application
1	1	Sanger,3730 xl DNA Analyzer	Sanger, Chain termination sequencing	1000b	>99.999	96 (capillaries)	20-180 min	ND	Targeted amplicon sequencing; Bacterial, fongal, viral identification; Microsatellite and STR analysis
	2	Ion Torrent Proton PII	Sequencing by synthesis	100b	>99%	330M	2-4 hrs	1419K/1K	Large (human, plant, animal) (Proton PII) and Small (microbe, virus) whole-Genome Sequencing ; Metagenomic; Transcriptomic; ChIP- Seq; Exome; Targeted DNA and RNA Sequencing
		Ion Torrent Proton PI		200b	>99%	82M	2-4 hrs	149K/1K	
		Ion Torrent PGM 318 <sup>a</sup>		400b	>99%	5.5M	4-7 hrs	50K/349	Small Whole-Genome Sequencing (microbe, virus); Targeted DNA and RNA Sequencing;ChIP- Seq
		Ion Torrent PGM 316 <sup>a</sup>		400b	>99%	3M	3-5 hrs	50K/349	
		Ion Torrent PGM 314 <sup>a</sup>		400b	>99%	0.6M	2-4h rs	50K/349	

		SOLiD 5500xl	Sequencing by ligation	2 x 60b	99.99%	800M	6 days	595K/10K	Human Whole Genome; Small Whole-Genome Sequencing (microbe, virus); Metagenomic; Transcriptomic; ChIP-Seq; Exome; Targeted DNA and RNA Sequencing
2		Genome Sequencer FLX+	Pyrosequencing	1000b	>99%	1M	23 hrs	500K/6K	Small Whole-Genome Sequencing (microbe, virus); Targeted Gene and RNA Sequencing; Transcriptomic (FLX+); Metagenomic (FLX+)
		Genome Sequencer Junior <sup>a</sup>		700b	>99%	0.1M	10 hrs	125K/1K	
3		HiSeq 2000	Sequencing by synthesis	2 × 100b	99.9%	2B	8 days	ND	Large (human, plant, animal) and Small (microbe, virus) whole-Genome Sequencing ; Targeted DNA and RNA Sequencing ; Exome Sequencing; Transcriptomic; Epigenetic ; Shotgun Metagenomic
		HiSeq 2500 High-Output Run /Rapid-Run mode		2 x 125 – 2 x 250b	99.9%	4B-1.2B	6 days– 60 hrs	740K / 29K	
		HiSeq 3000		2 × 150b	99.9%	2.5B	< 1–3.5 days	ND	
		HiSeq 4000		2 × 150b	99.9%	5B	< 1–3.5 days	ND	
		NextSeq 500		2 X 150b	99.9%	400M	12–30 hrs	250K/4K	
		Miseq <sup>a</sup>		2 X 300b	99.9%	25M	4–55 hrs	125K/1.4K	
		Miniseq <sup>a</sup>		2 X 150b	99.9%	25M	4–24 hrs	ND	



4	3	PacBio RS II: P6-C4	SMRT (single molecule real-time) sequencing	>20 kb <sup>b</sup>	>86% - >99.9% <sup>c</sup>	~55k	0.5 - 4 hrs	700K / 400	Large (human, plant, animal) (PacBio Sequel) and Small (microbe, virus) whole-Genome Sequencing ; Targeted DNA and RNA Sequencing
		PacBio Sequel		>20 kb <sup>b</sup>	>86% - >99.9% <sup>c</sup>	~ 365K	0.5 - 10 hrs	350K / 850	
5		Oxford Nanopore MinION	Nanopore sequencing	Variable (50 kb - up to hundreds of kb)	>92% - >97% <sup>c</sup>	4.4M <sup>d</sup>	1 min - 48 hrs	1000 / 500-900	Bacterial, fungal, viral identification; Genomic, transcriptomic, epigenetic

673 Note : <sup>a</sup> Desktop advice ; <sup>b</sup> 20Kb for half of the data; up to 60kb ; <sup>c</sup> consensus accuracy ; <sup>d</sup> Number of reads at 10 kb at standard speed.

## **Aknowledgments**

This publication was funded by grants from The French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety CoVetLab grant (ANSES) and the French Agricultural Research and International Cooperation Organization (CIRAD). This work was performed under the framework of the EurNegVec COST Action TD1303. We thank the “*Tiques et Maladies à Tiques (TMT)*” group of the CNRS “*Réseau Ecologie des Interactions Durables*” for stimulating discussion and support.

## **Author contributions**

MG wrote the paper. CRA, ACC, MVT, EA, and SM reviewed the manuscript. EA and SM supervised the manuscript.

## **References**

- Aguiar, D. M., Ziliani, T. F., Zhang, X., Melo, A. L. T., Braga, I. A., Witter, R., *et al.* (2014). A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 537–544. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.03.010.
- Aguirre, D. H., Gaido, A. B., Vinabal, A. E., Echaide, S. T. D., and Guglielmone, A. A. (1994). Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. *Parasite* 1, 405–407. doi:10.1051/parasite/1994014405.
- Aitken, T. H. G., Jonkers, A. H., Tikasingh, E. S., and Worth, C. B. (1968). Hughes Virus From Trinidadian Ticks And Terns. *J Med Entomol* 5, 501–503. doi:10.1093/jmedent/5.4.501.
- Allsopp, B. A. (2015). Heartwater-*Ehrlichia ruminantium* infection. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 34, 557–568.
- Alonso, M., Arellano-Sota, C., Cereser, V. H., Cordoves, C. O., Guglielmone, A. A., Kessler, R., *et al.* (1992). Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 11, 713–733.
- Andreotti, R., Pérez de León, A. A., Dowd, S. E., Guerrero, F. D., Bendele, K. G., and Scoles, G. A. (2011). Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol.* 11, 6. doi:10.1186/1471-2180-11-6.
- Andrew, H. R., and Norval, R. A. (1989). The role of males of the bont tick (*Amblyomma hebraeum*) in the transmission of *Cowdria ruminantium* (heartwater). *Vet. Parasitol.* 34, 15–23.
- Arraga-Alvarado, C. M., Qurollo, B. A., Parra, O. C., Berrueta, M. A., Hegarty, B. C., and Breitschwerdt, E. B. (2014). Molecular Evidence of *Anaplasma platys* Infection in

- 712 Two Women from Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 91, 1161–1165.  
713 doi:10.4269/ajtmh.14-0372.
- 714 Asgarali, Z., Coombs, D. K., Mohammed, F., Campbell, M. D., and Caesar, E. (2007). A  
715 serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad.  
716 *Veterinary Parasitology* 144, 167–171. doi:10.1016/j.vetpar.2006.09.015.
- 717 Baneth, G. (2014). Tick-borne infections of animals and humans: a common ground.  
718 *International Journal for Parasitology* 44, 591–596. doi:10.1016/j.ijpara.2014.03.011.
- 719 Baneth, G., Samish, M., Alekseev, E., Aroch, I., and Shkap, V. (2001). Transmission of  
720 *hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus*  
721 *sanguineus* ticks. *J. Parasitol.* 87, 606–611. doi:10.1645/0022-  
722 3395(2001)087[0606:TOHCTD]2.0.CO;2.
- 723 Barker, E. N., Tasker, S., Day, M. J., Warman, S. M., Woolley, K., Birtles, R., *et al.* (2010).  
724 Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma*  
725 *haemocanis* and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” in dogs. *Vet Microbiol*  
726 140, 167–170. doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.006.
- 727 Barre, N., and Garriss, G. I. (1990). Biology and ecology of *Amblyomma variegatum* (Acari :  
728 Ixodidae) in the Caribbean : implications for a regional eradication program. *Journal*  
729 *of Agricultural Entomology* 7, 1–9.
- 730 Basu, A. K., and Charles, R. A. (2017). “Chapter 2 - Ticks in the Caribbean Region,” in *Ticks*  
731 *of Trinidad and Tobago - an Overview* (Academic Press), 35–37. doi:10.1016/B978-0-  
732 12-809744-1.00002-5.
- 733 Belle, E. A., King, S. D., Griffiths, B. B., and Grant, L. S. (1980). Epidemiological  
734 investigation for arboviruses in Jamaica, West Indies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29,  
735 667–675.
- 736 Belli, A., Sarr, A., Rais, O., Rego, R. O. M., and Voordouw, M. J. (2017). Ticks infected via  
737 co-feeding transmission can transmit Lyme borreliosis to vertebrate hosts. *Sci Rep* 7.  
738 doi:10.1038/s41598-017-05231-1.
- 739 Bezerra da Silva, C., Santos, H. A., Navarrete, M. G., Ribeiro, C. C. D. U., Gonzalez, B. C.,  
740 Zaldivar, M. F., *et al.* (2016). Molecular detection and characterization of *Anaplasma*  
741 *platys* in dogs and ticks in Cuba. *Ticks Tick Borne Dis* 7, 938–944.  
742 doi:10.1016/j.ttbdis.2016.04.012.
- 743 Bezuidenhout, J. D. (1987). Natural transmission of heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54,  
744 349–351.
- 745 Bezuidenhout, J. D., and Jacobsz, C. J. (1986). Proof of transovarial transmission of *Cowdria*  
746 *ruminantium* by *Amblyomma herbraeum*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 53, 31–34.
- 747 Billeter, S. A., Kasten, R. W., Killmaster, L. F., Breitschwerdt, E. B., Levin, M. L., Levy, M.  
748 G., *et al.* (2012). Experimental infection by capillary tube feeding of *Rhipicephalus*  
749 *sanguineus* with *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii*. *Comp. Immunol.*  
750 *Microbiol. Infect. Dis.* 35, 9–15. doi:10.1016/j.cimid.2011.09.004.

751 Billeter, S. A., Levy, M. G., Chomel, B. B., and Breitschwerdt, E. B. (2008). Vector  
752 transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick  
753 transmission. *Medical and Veterinary Entomology* 22, 1–15. doi:10.1111/j.1365-  
754 2915.2008.00713.x.

755 Bonnet, S., Michelet, L., Moutailler, S., Cheval, J., Hébert, C., Vayssier-Taussat, M., *et al.*  
756 (2014). Identification of Parasitic Communities within European Ticks Using Next-  
757 Generation Sequencing. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2753.  
758 doi:10.1371/journal.pntd.0002753.

759 Boulouis, H.-J., Chang, C.-C., Henn, J. B., Kasten, R. W., and Chomel, B. B. (2005). Factors  
760 associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet. Res.* 36,  
761 383–410. doi:10.1051/vetres:2005009.

762 Breitschwerdt, E. B., Maggi, R. G., Lantos, P. M., Woods, C. W., Hegarty, B. C., and  
763 Bradley, J. M. (2010). *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* and *Bartonella henselae*  
764 bacteremia in a father and daughter with neurological disease. *Parasites & Vectors* 3,  
765 29. doi:10.1186/1756-3305-3-29.

766 Bremer, W. G., Schaefer, J. J., Wagner, E. R., Ewing, S. A., Rikihisa, Y., Needham, G. R., *et al.*  
767 (2005). Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis*  
768 by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol* 131, 95–105.  
769 doi:10.1016/j.vetpar.2005.04.030.

770 Butler, J. F., and Gibbs, E. P. J. (1984). Distribution of potential soft tick vectors of African  
771 swine fever in the Caribbean region (Acari: Argasidae). *Preventive Veterinary*  
772 *Medicine* 2, 63–70. doi:10.1016/0167-5877(84)90049-7.

773 Cabezas-Cruz, A., Zwegarth, E., Vancová, M., Broniszewska, M., Grubhoffer, L., Passos, L.  
774 M. F., *et al.* (2016). *Ehrlichia minasensis* sp. nov., a new species within the genus  
775 *Ehrlichia* isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*  
776 doi:10.1099/ijsem.0.000895.

777 Camus, E., and Barré, N. (1992). The role of *Amblyomma variegatum* in the transmission of  
778 heartwater with special reference to Guadeloupe. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 653, 33–41.

779 Camus, E., and Barre, N. (1995). Vector situation of tick-borne diseases in the Caribbean  
780 islands. *Veterinary Parasitology* 57, 167–176. doi:10.1016/0304-4017(94)03118-G.

781 Camus, E., and Montenegro-James, S. (1994). Bovine anaplasmosis and babesiosis in the  
782 Lesser Antilles: risk assessment of an unstable epidemiologic situation. *Vet. Res.* 25,  
783 313–317.

784 Carpi, G., Cagnacci, F., Wittekindt, N. E., Zhao, F., Qi, J., Tomsho, L. P., *et al.* (2011).  
785 Metagenomic Profile of the Bacterial Communities Associated with *Ixodes ricinus*  
786 Ticks. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0025604.

787 Collini, M., Albonico, F., Hauffe, H. C., and Mortarino, M. (2015). Identifying the last  
788 bloodmeal of questing sheep tick nymphs (*Ixodes ricinus* L.) using high resolution  
789 melting analysis. *Veterinary Parasitology* 210, 194–205.  
790 doi:10.1016/j.vetpar.2015.04.007.

- 791 Connell, M., and Hall, W. T. (1972). Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick  
792 *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* 48, 477.
- 793 Crom, R. L. (1992). Eradication of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Puerto Rico.  
794 *Annals of the New York Academy of Sciences* 653, 64–71. doi:10.1111/j.1749-  
795 6632.1992.tb19630.x.
- 796 Danielová, V., Marhoul, Z., Dusbábek, F., Ryba, J., Fernández, A., de la Cruz, J., *et al.*  
797 (1982). Isolation of Hughes virus from ticks in Cuba. *Acta Virol.* 26, 186–189.
- 798 Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus*  
799 *sanguineus*. *Parasites & Vectors* 3, 26. doi:10.1186/1756-3305-3-26.
- 800 Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., and Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: a  
801 One Health perspective. *Trends Parasitol.* 28, 437–446. doi:10.1016/j.pt.2012.07.003.
- 802 Da Silva Rodrigues, V. da S., Garcia, M. V., Cruz, B. C., Maciel, W. G., Zimmermann, N. P.,  
803 Koller, W. W., *et al.* (2017). Life cycle and parasitic competence of *Dermacentor*  
804 *nitens* Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae) on different animal species. *Ticks Tick Borne*  
805 *Dis* 8, 379–384. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.12.014.
- 806 Day, M. J. (2011). One health: the importance of companion animal vector-borne diseases.  
807 *Parasites & Vectors* 4, 49. doi:10.1186/1756-3305-4-49.
- 808 De la Cruz, J. O. de la (2001). *Biogeography of the West Indies: Patterns and Perspectives*,  
809 *Second Edition*. CRC Press.
- 810 De la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J. M., Kocan, K. M., and  
811 Willadsen, P. (2007). A ten-year review of commercial vaccine performance for  
812 control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev* 8, 23–28.  
813 doi:10.1017/S1466252307001193.
- 814 De la Fuente, J., Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A. G., Estrada-Peña,  
815 A., *et al.* (2017). Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of  
816 Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 114.  
817 doi:10.3389/fcimb.2017.00114.
- 818 Dessau, R. B. (2012). Infection due to *Borrelia burgdorferi* most likely does not occur in  
819 Cuba. *Braz J Infect Dis* 16, 404; author reply 405–406. doi:10.1016/j.bjid.2012.06.007.
- 820 Diuk-Wasser, M. A., Vannier, E., and Krause, P. J. (2016). Coinfection by *Ixodes* Tick-Borne  
821 Pathogens: Ecological, Epidemiological, and Clinical Consequences. *Trends in*  
822 *Parasitology* 32, 30–42. doi:10.1016/j.pt.2015.09.008.
- 823 Dugat, T., Lagrée, A.-C., Maillard, R., Boulouis, H.-J., and Haddad, N. (2015). Opening the  
824 black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future  
825 perspectives. *Anaplasma phagocytophilum*, 61. doi:10.3389/fcimb.2015.00061.
- 826 Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S., and Jourdain, E. (2015). The  
827 Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been  
828 Demonstrated? *Trends in Parasitology* 31, 536–552. doi:10.1016/j.pt.2015.06.014.

- 829 Estrada-Peña, A. (2015). Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Rev. sci. tech. Off.*  
830 *int. Epiz.* 34, 53–65.
- 831 Estrada-Peña, A., Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., and Nijhof, A. M. (2013). Research on the  
832 ecology of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats.  
833 *Front Cell Infect Microbiol* 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00029.
- 834 Estrada-Peña, A., Guglielmone, A. A., and Mangold, A. J. (2004). The distribution and  
835 ecological “preferences” of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an  
836 ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. *Ann Trop Med Parasitol*  
837 98, 283–292. doi:10.1179/000349804225003316.
- 838 Faria, N. R., Quick, J., Claro, I. M., Thézé, J., de Jesus, J. G., Giovanetti, M., *et al.* (2017).  
839 Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas.  
840 *Nature* 546, 406–410. doi:10.1038/nature22401.
- 841 Flanigan, T. P., Schwan, T. G., Armstrong, C., Voris, V., P. L., and Salata, R. A. (1991).  
842 Relapsing Fever in the US Virgin Islands: A Previously Unrecognized Focus of  
843 Infection. *J Infect Dis* 163, 1391–1392. doi:10.1093/infdis/163.6.1391.
- 844 Futse, J. E., Ueti, M. W., Knowles, D. P., and Palmer, G. H. (2003). Transmission of  
845 *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the  
846 absence of vector-pathogen interaction. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3829–3834.
- 847 Gebreyes, W. A., Dupouy-Camet, J., Newport, M. J., Oliveira, C. J. B., Schlesinger, L. S.,  
848 Saif, Y. M., *et al.* (2014). The Global One Health Paradigm: Challenges and  
849 Opportunities for Tackling Infectious Diseases at the Human, Animal, and  
850 Environment Interface in Low-Resource Settings. *PLoS Negl Trop Dis* 8.  
851 doi:10.1371/journal.pntd.0003257.
- 852 George, J. E., Davey, R. B., and Pound, J. M. (2002). Introduced ticks and tick-borne  
853 diseases: the threat and approaches to eradication. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.*  
854 *Pract.* 18, 401–416, vi.
- 855 Georges, K., Ezeokoli, C. D., Newaj-Fyzul, A., Campbell, M., Mootoo, N., Mutani, A., *et al.*  
856 (2008). The application of PCR and reverse line blot hybridization to detect arthropod-  
857 borne hemopathogens of dogs and cats in Trinidad. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 196–  
858 199. doi:10.1196/annals.1428.082.
- 859 Ghosh, S., Bansal, G. C., Gupta, S. C., Ray, D., Khan, M. Q., Irshad, H., *et al.* (2007). Status  
860 of tick distribution in Bangladesh, India and Pakistan. *Parasitol Res* 101, 207–216.  
861 doi:10.1007/s00436-007-0684-7.
- 862 Guglielmone, A. A., Beati, L., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B., Nava, S., Venzal, J.  
863 M., *et al.* (2006). Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol* 40,  
864 83–100. doi:10.1007/s10493-006-9027-0.
- 865 Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A.,  
866 Shao, R., *et al.* (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of  
867 the world : a list of valid species names.
- 868 Hoff, B., McEwen, B., and Peregrine, A. S. (2008). A survey for infection with *Dirofilaria*

- 869 *immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Babesia canis* in feral and client-  
870 owned dogs in the Turks and Caicos Islands, British West Indies. *Can Vet J* 49, 593–  
871 594.
- 872 Jongejans, F., and Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129  
873 Suppl, S3-14.
- 874 Jonkers, A. H., Casals, J., Aitken, T. H. G., and Spence, L. (1973). Soldado Virus, a New  
875 Agent from Trinidadian *Ornithodoros* Ticks. *Journal of Medical Entomology* 10, 517–  
876 519. doi:10.1093/jmedent/10.5.517.
- 877 Kelly, P. J., Fournier, P.-E., Parola, P., and Raoult, D. (2003). A survey for spotted fever  
878 group rickettsiae and ehrlichiae in *Amblyomma variegatum* from St. Kitts and Nevis.  
879 *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 58–59.
- 880 Kelly, P. J., Lucas, H., Ereemeeva, M. E., Dirks, K. G., Rolain, J. M., Yowell, C., *et al.*  
881 (2010a). *Rickettsia felis*, West Indies. *Emerg Infect Dis* 16, 570–571.  
882 doi:10.3201/eid1603.091431.
- 883 Kelly, P.J., Lucas, H., Beati, L., Yowell, C., Mahan, S., and Dame, J. (2010b). *Rickettsia*  
884 *africae* in *Amblyomma variegatum* and domestic ruminants on eight Caribbean  
885 islands. *J. Parasitol.* 96, 1086–1088. doi:10.1645/GE-2552.1.
- 886
- 887 Kelly, P. J., Lucas, H., Yowell, C., Beati, L., Dame, J., Urdaz-Rodriguez, J., *et al.* (2011).  
888 *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* and domestic ruminants in the  
889 Caribbean. *J. Med. Entomol.* 48, 485–488.
- 890 Kelly, P. J., Xu, C., Lucas, H., Loftis, A., Abete, J., Zeoli, F., *et al.* (2013). Ehrlichiosis,  
891 babesiosis, anaplasmosis and hepatozoonosis in dogs from St. Kitts, West Indies.  
892 *PLoS ONE* 8, e53450. doi:10.1371/journal.pone.0053450.
- 893 Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., and Ewing, S. A. (2010). The  
894 natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology* 167, 95–107.  
895 doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.012.
- 896 Labuda, M., and Nuttall, P. A. (2004). Tick-borne viruses. *Parasitology* 129 Suppl, S221-245.
- 897 Lamattina, D., and Nava, S. (2016). Ticks infesting humans in northern Misiones, Argentina.  
898 *Medicina (Buenos Aires)* 76, 89–92.
- 899 Lantos, P. M., Brinkerhoff, R. J., Wormser, G. P., and Clemen, R. (2013). Empiric Antibiotic  
900 Treatment of Erythema Migrans-Like Skin Lesions As a Function of Geography: A  
901 Clinical and Cost Effectiveness Modeling Study. *Vector Borne Zoonotic Dis* 13, 877–  
902 883. doi:10.1089/vbz.2013.1365.
- 903 Laroche, M., Marie, J., Mediannikov, O., Almeras, L., Berenger, J.-M., Musso, D., *et al.*  
904 (2016). A novel ehrlichial agent detected in tick in French Polynesia. *Ticks Tick Borne*  
905 *Dis* 7, 1203–1208. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.07.014.
- 906 Li, J., Kelly, P., Zhang, J., Xu, C., and Wang, C. (2015). Development of a pan-*Babesia*

907 FRET-qPCR and a survey of livestock from five Caribbean islands. *BMC Veterinary*  
908 *Research* 11. doi:10.1186/s12917-015-0560-0.

909 Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., *et al.* (2012). Comparison of Next-Generation  
910 Sequencing Systems. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2012/251364.

911 Loftis, A. D., Kelly, P. J., Freeman, M. D., Fitzharris, S., Beeler-Marfisi, J., and Wang, C.  
912 (2013). Tick-borne pathogens and disease in dogs on St. Kitts, West Indies. *Vet.*  
913 *Parasitol.* 196, 44–49. doi:10.1016/j.vetpar.2013.01.024.

914 Loftis, A. D., Kelly, P. J., Paddock, C. D., Blount, K., Johnson, J. W., Gleim, E. R., *et al.*  
915 (2016). Panola Mountain *Ehrlichia* in *Amblyomma maculatum* From the United States  
916 and *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) From the Caribbean and Africa. *J.*  
917 *Med. Entomol.* doi:10.1093/jme/tjv240.

918 Lu, H., Giordano, F., and Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION Sequencing and  
919 Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 14, 265–279.  
920 doi:10.1016/j.gpb.2016.05.004.

921 Málková, D., Holubová, J., Cerný, V., Daniel, M., Fernández, A., de la Cruz, J., *et al.* (1985).  
922 Estero real virus: a new virus isolated from argasid ticks *Ornithodoros tadaridae* in  
923 Cuba. *Acta Virol.* 29, 247–250.

924 Mans, B. J., Gothe, R., and Neitz, A. W. H. (2004). Biochemical perspectives on paralysis and  
925 other forms of toxicoses caused by ticks. *Parasitology* 129 Suppl, S95-111.

926 Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Fuente, J. de la, and Pérez-Sánchez, R. (2012). Soft  
927 Ticks as Pathogen Vectors: Distribution, Surveillance and Control.  
928 doi:10.5772/32521.

929 Mardis, E. R. (2008). Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum*  
930 *Genet.* 9: 387-402. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.

931 Mathew, J. S., Ewing, S. A., Panciera, R. J., and Woods, J. P. (1998). Experimental  
932 transmission of *Hepatozoon americanum* Vincent-Johnson *et al.*, 1997 to dogs by the  
933 Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* Koch. *Veterinary Parasitology* 80, 1–14.  
934 doi:10.1016/S0304-4017(98)00189-7.

935 McCown, M. E., Opel, T., and Grzeszak, B. (2013). Vector-borne disease surveillance in  
936 Puerto Rico: pathogen prevalence rates in canines ? Implications for public health and  
937 the U.S. Military ? Applying the one health concept. *J Spec Oper Med* 13, 59–63.

938 Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., *et al.*  
939 (2014). High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front Cell*  
940 *Infect Microbiol* 4. doi:10.3389/fcimb.2014.00103.

941 Modrý, D., Beck, R., Hrazdilová, K., and Baneth, G. (2017). A Review of Methods for  
942 Detection of *Hepatozoon* Infection in Carnivores and Arthropod Vectors. *Vector-*  
943 *Borne and Zoonotic Diseases* 17, 66–72. doi:10.1089/vbz.2016.1963.

944 Morel, P. C. (1966). Etude sur les tiques du bétail en Guadeloupe et Martinique 1. Les tiques  
945 et leur distribution (Acariens, ixodoidea). *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire*



- 946 des pays tropicaux 19 (3) : 307-321.
- 947 Morel, P. C. (1967). Etudes sur les tiques du bétail en Guadeloupe et Martinique. II. Agents  
948 pathogènes transmis par les tiques. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des*  
949 *pays tropicaux* 20(2) : 291-299.
- 950 Moutailler, S., Moro, C. V., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F. H., Devillers, E., *et al.*  
951 (2016a). Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLOS Neglected*  
952 *Tropical Diseases* 10, e0004539. doi:10.1371/journal.pntd.0004539.
- 953 Moutailler, S., Popovici, I., Devillers, E., Vayssier-Taussat, M., and Eloit, M. (2016b).  
954 Diversity of viruses in *Ixodes ricinus*, and characterization of a neurotropic strain of  
955 Eyach virus. *New Microbes and New Infections* 11, 71–81.  
956 doi:10.1016/j.nmni.2016.02.012.
- 957 Nakao, R., Abe, T., Nijhof, A. M., Yamamoto, S., Jongejan, F., Ikemura, T., *et al.* (2013). A  
958 novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing Maps), to the  
959 microbiome analysis of ticks. *ISME J* 7, 1003–1015. doi:10.1038/ismej.2012.171.
- 960 Narasimhan, S., and Fikrig, E. (2015). Tick microbiome: the force within. *Trends Parasitol*  
961 31, 315–323. doi:10.1016/j.pt.2015.03.010.
- 962 Parola, P., and Barre, N. (2004). *Rickettsia africae*, the agent of African tick-bite fever: an  
963 emerging pathogen in the West Indies and Reunion Island (Indian Ocean). *Bull Soc*  
964 *Pathol Exot* 97, 193–198.
- 965 Parola, P., Jourdan, J., and Raoult, D. (1998). Tick-borne infection caused by *Rickettsia*  
966 *africae* in the West Indies. *N. Engl. J. Med.* 338, 1391.  
967 doi:10.1056/NEJM199805073381918.
- 968 Parola, P., and Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an  
969 emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32, 897–928. doi:10.1086/319347.
- 970 Parola, P., Vestris, G., Martinez, D., Brochier, B., Roux, V., and Raoult, D. (1999). Tick-  
971 borne rickettiosis in Guadeloupe, the French West Indies: isolation of *Rickettsia*  
972 *africae* from *Amblyomma variegatum* ticks and serosurvey in humans, cattle, and  
973 goats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 888–893.
- 974 Pegram, R. G., Wilshire, A. J., Lockhart, C., Pacer, R. E., and Eddi, C. S. (2007). “The  
975 Caribbean *Amblyomma variegatum* Eradication Programme: Success or Failure?,” in  
976 *Area-Wide Control of Insect Pests*, eds. M. J. B. Vreysen, A. S. Robinson, and J.  
977 Hendrichs (Dordrecht: Springer Netherlands), 709–720.
- 978 Pegram, R. G., Wilson, D. D., and Hansen, J. W. (2000). Past and present national tick control  
979 programs. Why they succeed or fail. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 546–554.
- 980 Pegram, R., Indar, L., Eddi, C., and George, J. (2004). The Caribbean *Amblyomma* Program:  
981 some ecologic factors affecting its success. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 302–311.  
982 doi:10.1196/annals.1307.056.
- 983 Penrith, M.-L. (2009). African swine fever. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 76, 91–95.

984 Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., Xiong, Q., and Rikihisa, Y. (2006). Human  
985 infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. N. Y.*  
986 *Acad. Sci.* 1078, 110–117. doi:10.1196/annals.1374.016.

987 Qablan, M. A., Kubelová, M., Šíroký, P., Modrý, D., and Amr, Z. S. (2012). Stray dogs of  
988 northern Jordan as reservoirs of ticks and tick-borne hemopathogens. *Parasitol Res*  
989 111, 301–307. doi:10.1007/s00436-012-2839-4.

990 Quick, J., Grubaugh, N. D., Pullan, S. T., Claro, I. M., Smith, A. D., Gangavarapu, K., *et al.*  
991 (2017). Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and  
992 other virus genomes directly from clinical samples. *Nat. Protocols* 12, 1261–1276.  
993 doi:10.1038/nprot.2017.066.

994 Randolph, S. E., Gern, L., and Nuttall, P. A. (1996). Co-feeding ticks: Epidemiological  
995 significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 12,  
996 472–479.

997 Reeves, W. K., Loftis, A. D., Nicholson, W. L., and Czarkowski, A. G. (2008). The first  
998 report of human illness associated with the Panola Mountain *Ehrlichia* species: a case  
999 report. *J Med Case Rep* 2, 139. doi:10.1186/1752-1947-2-139.

1000 Rhoads, A., and Au, K. F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics*  
1001 *Proteomics Bioinformatics* 13, 278–289. doi:10.1016/j.gpb.2015.08.002.

1002 Robinson, J. B., Eremeeva, M. E., Olson, P. E., Thornton, S. A., Medina, M. J., Sumner, J.  
1003 W., *et al.* (2009). New approaches to detection and identification of *Rickettsia africae*  
1004 and *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) ticks from  
1005 the Caribbean. *J. Med. Entomol.* 46, 942–951.

1006 Rodríguez, I., Fernández, C., Cinco, M., Pedroso, R., and Fuentes, O. (2004). Do  
1007 Antiborrelial Antibodies Suggest Lyme Disease in Cuba? *Emerg Infect Dis* 10, 1698–  
1008 1700. doi:10.3201/eid1009.031048.

1009 Rodríguez, I., Fernández, C., Sánchez, L., Martínez, B., Siegrist, H. H., and Lienhard, R.  
1010 (2012). Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in humans from  
1011 a Cuban village. *Braz J Infect Dis* 16, 82–85.

1012 Rodriguez, O. N., Rodriguez, P., Espaine, L., and Rivas, A. (1989a). Frequency of  
1013 haemoparasites in sheep in Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias* 20, 1, 57-  
1014 70

1015 Rodriguez, O.N., Espaine, L., Rivas, A., and Rodriguez, P.. (1989b). Epidemiology of cattle  
1016 diseases caused by haemoparasites in Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*  
1017 20, 1, 37-56

1018 Rodríguez-Mallon, A. (2016). Developing Anti-tick Vaccines. *Methods Mol. Biol.* 1404, 243–  
1019 259. doi:10.1007/978-1-4939-3389-1\_17.

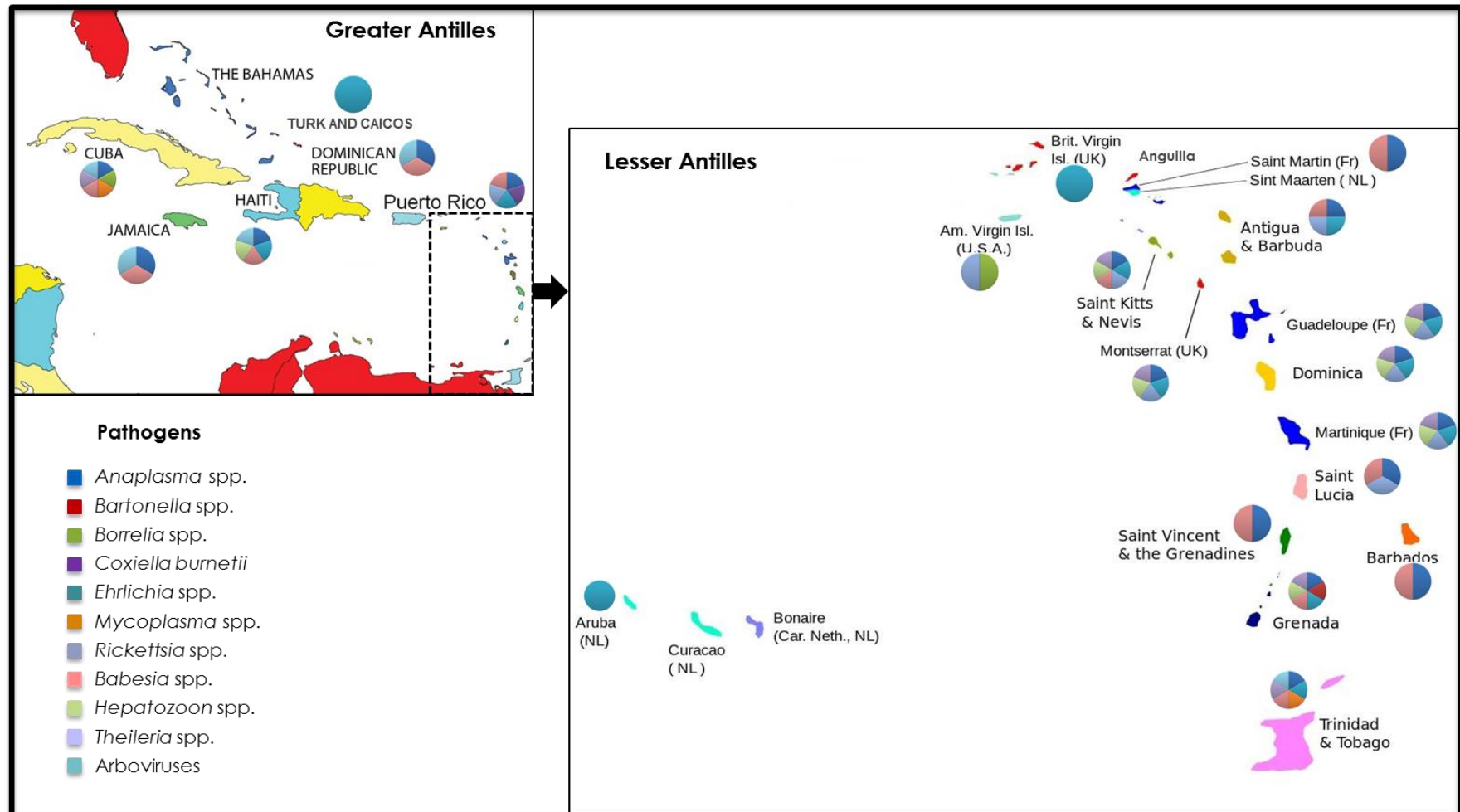
1020 Sant, C., Georges, K. C., and Pow-Brown, P. (2017). Novel incidental finding of *Hepatozoon*  
1021 *canis* infection in two dogs of the same household in Trinidad, West Indies. *Veterinary*  
1022 *Parasitology: Regional Studies and Reports* 9, 98–103.  
1023 doi:10.1016/j.vprsr.2017.06.003.

- 1024 Schotthoefer, A. M., and Frost, H. M. (2015). Ecology and Epidemiology of Lyme  
1025 Borreliosis. *Clinics in Laboratory Medicine* 35, 723–743.  
1026 doi:10.1016/j.cll.2015.08.003.
- 1027 Scoles, G. A., and Ueti, M. W. (2013). *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological  
1028 vector of *Theileria equi*. *Parasit Vectors* 6, 306. doi:10.1186/1756-3305-6-306.
- 1029 Sharma, A., Jaimungal, S., Basdeo-Maharaj, K., Rao, A. V. C., and Teelucksingh, S. (2010).  
1030 Erythema Migrans–like Illness among Caribbean Islanders. *Emerg Infect Dis* 16,  
1031 1615–1617. doi:10.3201/eid1610.100587.
- 1032 Starkey, L. A., Newton, K., Bruncker, J., Crowdis, K., Edourad, E. J. P., Meneus, P., *et al.*  
1033 (2016). Prevalence of vector-borne pathogens in dogs from Haiti. *Vet. Parasitol.* 224,  
1034 7–12. doi:10.1016/j.vetpar.2016.04.017.
- 1035 Tamsitt, J. R., and Valdivieso, D. (1970). murcielagos y la salud publica-estudio con especial  
1036 referencia a Puerto Rico. *Ofic Sanit Panamer Bol.*
- 1037 Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A., Kappmeyer, L. S., and Knowles, D. P. (2008).  
1038 Persistently Infected Horses Are Reservoirs for Intrastadial Tick-Borne Transmission  
1039 of the Apicomplexan Parasite *Babesia equi*. *Infect. Immun.* 76, 3525–3529.  
1040 doi:10.1128/IAI.00251-08.
- 1041 Uilenberg, G. (2006). *Babesia*--a historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3–10.  
1042 doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.035.
- 1043 Uilenberg, G., Camus, E., and Barré, N. (1983). Existence of *Theileria mutans* and *Theileria*  
1044 *velifera* (Sporozoa, Theileriidae) in Guadeloupe (French West Indies). *Rev Elev Med*  
1045 *Vet Pays Trop* 36, 261–264.
- 1046 Urdaz-Rodríguez, J. H., Fosgate, G. T., Waghela, S. D., Alleman, A. R., Rae, D. O.,  
1047 Donovan, G. A., *et al.* (2009). Seroprevalence estimation and management factors  
1048 associated with high herd seropositivity for *Babesia bovis* in commercial dairy farms  
1049 of Puerto Rico. *Trop Anim Health Prod* 41, 1465–1473. doi:10.1007/s11250-009-  
1050 9335-6.
- 1051 Vachiéry, N., Jeffery, H., Pegram, R., Aprelon, R., Pinarello, V., Kandassamy, R. L. Y., *et al.*  
1052 (2008). *Amblyomma variegatum* ticks and heartwater on three Caribbean Islands. *Ann.*  
1053 *N. Y. Acad. Sci.* 1149, 191–195. doi:10.1196/annals.1428.081.
- 1054 Valle, M. R., Mèndez, L., Valdez, M., Redondo, M., Espinosa, C. M., Vargas, M., *et al.*  
1055 (2004). Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination  
1056 with the anti-tick vaccine Gavac. *Exp. Appl. Acarol.* 34, 375–382.
- 1057 Vayssier-Taussat, M., Kazimirova, M., Hubalek, Z., Hornok, S., Farkas, R., Cosson, J.-F., *et*  
1058 *al.* (2015). Emerging horizons for tick-borne pathogens: from the “one pathogen–one  
1059 disease” vision to the pathobiome paradigm. *Future Microbiology* 10, 2033–2043.  
1060 doi:10.2217/fmb.15.114.
- 1061 Vayssier-Taussat, M., Moutailler, S., Michelet, L., Devillers, E., Bonnet, S., Cheval, J., *et al.*  
1062 (2013). Next Generation Sequencing Uncovers Unexpected Bacterial Pathogens in  
1063 Ticks in Western Europe. *PLoS ONE* 8, e81439. doi:10.1371/journal.pone.0081439.

- Vial, L. (2009). Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite* 16, 191–202.
- Walker, A. R., Bouattour, A., Camicas, J.-L., Estrada-Peña, A., Horak, I. G., Latif, A. A., *et al.* (2003). Ticks of domestic animals in Africa. A guide to identification of species. Edinburgh: Bioscience Reports; 2003. p. 221
- Wise, L. n., Kappmeyer, L. s., Mealey, R. h., and Knowles, D. p. (2013). Review of Equine Piroplasmiasis. *J Vet Intern Med* 27, 1334–1346. doi:10.1111/jvim.12168.
- Yabsley, M. J., McKibben, J., Macpherson, C. N., Cattan, P. F., Cherry, N. A., Hegarty, B. C., *et al.* (2008). Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Vet. Parasitol.* 151, 279–285. doi:10.1016/j.vetpar.2007.11.008.
- Yssouf, A., Almeras, L., Berenger, J.-M., Laroche, M., Raoult, D., and Parola, P. (2015). Identification of tick species and disseminate pathogen using hemolymph by MALDI-TOF MS. *Ticks and Tick-borne Diseases* 6, 579–586. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.04.013.
- Zhang, J., Kelly, P., Guo, W., Xu, C., Wei, L., Jongejan, F., *et al.* (2015a). Development of a generic *Ehrlichia* FRET-qPCR and investigation of ehrlichioses in domestic ruminants on five Caribbean islands. *Parasit Vectors* 8, 506. doi:10.1186/s13071-015-1118-5.
- Zhang, J., Kelly, P., Li, J., Xu, C., and Wang, C. (2015b). Molecular Detection of *Theileria* spp. in Livestock on Five Caribbean Islands. *BioMed Research International* 2015, e624728. doi:10.1155/2015/624728.
- Zhang, R. L., and Zhang, B. (2014). Prospects of using DNA barcoding for species identification and evaluation of the accuracy of sequence databases for ticks (Acari: Ixodida). *Ticks Tick Borne Dis* 5, 352–358. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.01.001.

## **Figure legend**

**Figure 1. Current and historical distribution of tick-borne pathogens reported in the West Indies. The pathogens covered in this review include bacteria (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp., *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp., *Coxiella* spp.), protozoa (*Babesia* spp., *Theileria* spp., and *Hepatozoon* spp.), and arboviruses (African swine fever virus, Soldado virus, Hughes Virus, Wad Medani Virus, and Estero Real Virus). Pathogen groups and political borders are illustrated by different colors in the representative pie charts and key.**



### **3. Objectifs de la thèse**

Au regard de l'importance économique et sanitaire des maladies transmises par les tiques, et du manque significatif de données épidémiologiques actuelles concernant les agents pathogènes circulant dans les tiques des Caraïbes, il est souhaitable de développer de nouveaux outils de dépistage à haut débit. La surveillance en temps réel d'un large panel d'agents pathogènes permettrait ainsi d'évaluer le risque d'émergence ou de diffusion des maladies à tique dans la zone. C'est dans ce contexte d'amélioration des performances de veille sanitaire des maladies à tiques dans les Caraïbes que pris place ce projet de thèse. La visée de la thèse était de faire un état des lieux des agents pathogènes d'intérêt médical et vétérinaire, de type bactéries, parasites et virus, présents dans les tiques caribéennes à l'aide de techniques de détection à haut débit. Pour cela nous avons :

(1) Réalisé un séquençage à haut débit de type RNASeq sur des échantillons d'ARN extraits de tiques collectées en Guadeloupe et Martinique. L'objectif du séquençage était de faire un inventaire sans à priori des microorganismes (bactéries, parasites, et virus) présents dans les tiques, et ainsi de détecter des agents pathogènes attendus, non suspectés, voir même nouveaux, circulant potentiellement dans les Antilles.

(2) Développé un outil de dépistage à large échelle permettant la détection ciblée d'agents pathogènes transmis par les tiques susceptibles de circuler dans les Caraïbes. La liste des agents pathogènes à détecter comprend d'une part, les bactéries, parasites et virus transmis par les tiques dans les caraïbes rapportés dans la littérature, et d'autre part, les microorganismes d'intérêt identifiés lors du séquençage (Chapitre 1 de la thèse). L'outil de détection est un support microfluidique de type puce à ADN, basé sur la technologie BioMark™ dynamic arrays (Fluidigm Corporation) qui permet de réaliser de la PCR en temps réel à haut débit afin de détecter simultanément 48 à 96 cibles au sein de 48 à 96 échantillons. Deux puces ont été développées, une première pour le suivi des bactéries et parasites au sein d'échantillon d'ADN, et une deuxième pour le suivi des virus au sein d'échantillon d'ARN. La performance des deux outils de dépistage a été testée sur des échantillons de terrain, en réalisant un criblage des agents pathogènes présents dans les tiques collectées en Guadeloupe et en Martinique.

(3) Organisé une collecte de tiques à travers différentes îles des Caraïbes, à l'aide du réseau caribéen de santé animale (CaribVET). Ces tiques doivent être analysées à l'aide des outils de PCR microfluidique en temps réel à haut débit développé (Chapitre 2 de la thèse) afin de réaliser une étude épidémiologique à large échelle des agents pathogènes présents dans la zone des Caraïbes.

# **CHAPITRE 1**

**Détection par séquençage de nouvelle génération des  
microorganismes et agents pathogènes présents dans  
les tiques de Guadeloupe et de Martinique**



## **1. Introduction**

Les technologies de séquençage de nouvelle génération permettent de réaliser un inventaire sans *a priori* des microorganismes et agents pathogènes présents dans les tiques, y compris ceux non cultivables. Parmi le répertoire de technologies de séquençage disponibles, notre choix c'est porté sur la technologie RNASeq Illumina. Cette méthode permet le séquençage du transcriptome total de la tique, présentant ainsi deux avantages principaux : (1) la détection de microorganismes répliatifs, (2) la détection simultanée d'un large panel de microorganismes, aussi bien eucaryotes, tels que les parasites, que procaryotes, et les virus. Cette technique a déjà été utilisée lors de précédentes études visant à caractériser le pathobiome de la tique *Ixodes ricinus*. Le séquençage de type RNAseq s'est avéré être un outil de détection épidémiologique très puissant, permettant la caractérisation d'agents pathogènes attendus et inattendus de types bactérien (Vayssier *et al.*, 2013), parasitaire (Bonnet *et al.*, 2014), et viral (Moutailler *et al.*, 2016).

Les tiques analysées dans cette étude ont été collectées sur bovins en Guadeloupe et en Martinique. Deux espèces ont ainsi été prélevées : *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus*. Les ARNs (acides ribonucléiques) de ces tiques ont été extraits puis groupés en un seul échantillon, qui après rétro-transcription en ADNc (ADN complémentaire), a été soumis au séquençage.

Le séquençage du transcriptome total des tiques de Guadeloupe et de Martinique a pour but la détection d'agents pathogènes et de microorganismes de type bactéries, parasites, ou virus (1) attendus, et donc connus pour circuler dans les tiques caribéennes, (2) inattendus, cela signifie que les agent pathogènes en question ne sont pas connus pour circuler dans cette zone d'étude ou ne sont pas associés aux deux espèces de tiques analysées, (3) nouveaux, suggérant la présence de microorganismes non caractérisés, mais associés à des familles microbiennes incluant des pathogènes.

## **2. Matériel et Méthode**

### **2.1. Collecte des tiques en Guadeloupe et Martinique**

La méthode d'échantillonnage des tiques utilisée dans le contexte de cette étude repose sur une approche exploratrice de type criblage ou « screening ». Les tiques ont été directement prélevées sur leurs hôtes, ici des bovins. Dans la mesure où cela était possible, il avait été décidé de collecter 5 bovins par élevage, avec un maximum de 10 tiques échantillonnées par animal. Les tiques collectées devaient être vivantes, pas ou peu gorgées de préférence, afin de ne pas biaiser les analyses de détection des agents pathogènes.

Au total, 597 tiques ont été collectées via deux campagnes d'échantillonnages organisées en Guadeloupe et en Martinique avant le début de cette thèse. En Guadeloupe, dans le cadre du projet PathoID (étude du pathobiome des rongeurs et des tiques), 22 élevages ont été sélectionnés et 40 bovins ont été prélevés. 312 tiques ont ainsi été collectées entre février 2014 et Janvier 2015, incluant 137 spécimens adultes d'*Amblyomma variegatum*, et 175 spécimens adultes de *Rhipicephalus microplus*. En Martinique, dans le cadre du projet ResisT (étude de la résistance aux acaricides des tiques *Rhipicephalus microplus*), 29 élevages ont été sélectionnés et 29 bovins ont été prélevés. 285 spécimens adultes de *Rhipicephalus microplus* ont été collectés entre Février et Mars 2015. Les Figures 1 et 2 représentent les points de collecte des tiques en Guadeloupe et en Martinique. Les tableaux décrivant le nombre de tiques collectées et leurs origines sont disponibles en Annexe 1 et 2.

Une fois retirées de l'hôte, les tiques ont été placées dans des tubes de collecte, un tube regroupant l'ensemble des tiques échantillonnées sur un même animal, puis conservées à -80°C en attente de traitement.

L'identification des tiques a été réalisée directement sur le terrain lors de la collecte, et confirmée par la suite au laboratoire du CIRAD. Les clés d'identification morphologique des tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* sont disponibles dans l'étude de Walker *et al.*, 2003.

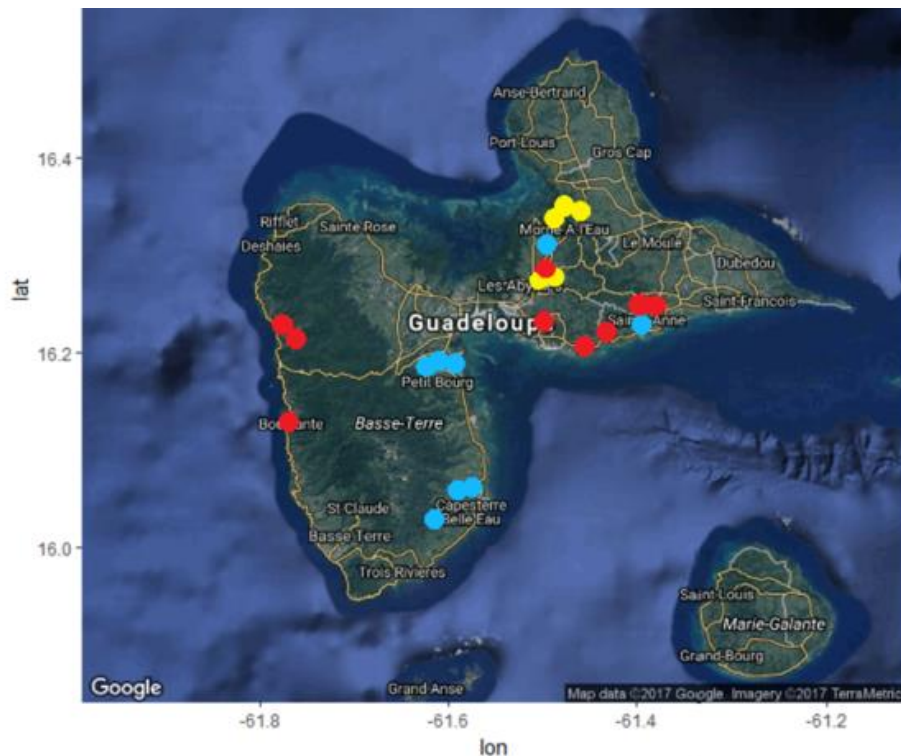


Figure 2. Points de collecte des tiques en Guadeloupe (cartographie réalisé avec le logiciel R). Rond jaune : point de collecte des spécimens *Rhipicephalus microplus* ; Rond rouge : point de collecte des spécimens *Amblyomma variegatum* ; Rond bleu : point de collecte où les espèces *Rhipicephalus microplus* et *Amblyomma variegatum* ont toutes deux été prélevées, parfois sur le même animal.

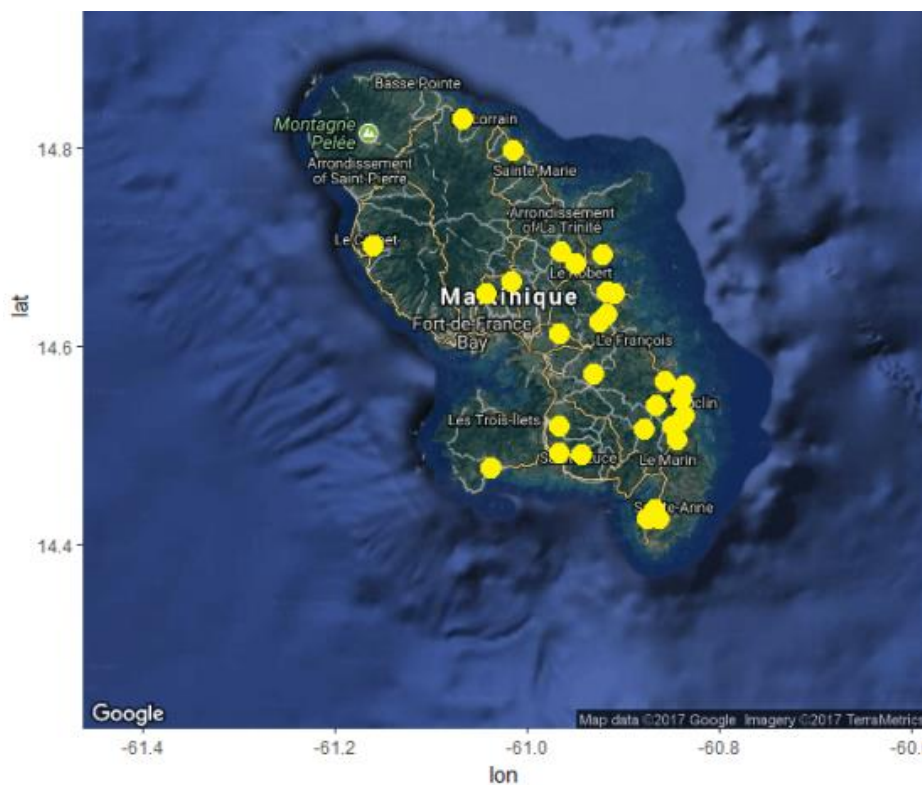


Figure 3. Points de collecte des tiques *Rhipicephalus microplus* en Martinique (cartographie réalisé avec le logiciel R).

## **2.2. Traitement des échantillons de tiques en vue du séquençage**

### ***2.2.1. Broyat des échantillons de tiques***

Les tiques ont été placées dans des tubes de 2mL SafeLock, à raison d'environ 20 mg de tique par tube, ce qui correspond généralement à une tique entière. Cependant, dans le cas de tique ayant un poids supérieur à 20 mg, la tique a été découpée en deux à l'aide d'un scalpel et seulement la moitié a été traitée, et dans le cas de tiques ayant un poids inférieur à 20 mg, des pools de 2 à 4 adultes ont été réalisés. Ensuite, 1 mL de PBS (tampon phosphate salin) 1X à froid a été ajouté aux échantillons pour les nettoyer à l'aide du Tissue Lyser (Qiagen) pendant 2 à 3 minutes à  $7 \text{ Hz.s}^{-1}$ . Après avoir jeté le surnageant, les échantillons ont été placés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant 15 à 20 minutes, puis une bille de 5 mm a été ajoutée. Les échantillons sont alors broyés à sec avec le Tissue Lyser (Qiagen) pendant 2 minutes à  $30 \text{ Hz.s}^{-1}$ , en deux fois. Après broyage, 450  $\mu\text{L}$  de PBS1X froid ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été vortexés pendant 10 secondes, puis centrifugés pendant 2 à 3 minutes à 8000 g. Après centrifugation, le surnageant doit être clair, si ce n'est pas le cas il faut répéter l'étape de centrifugation. Finalement 20  $\mu\text{L}$  de Protéinase K (PK) ont été ajoutés à 180  $\mu\text{L}$  de broyat. Au final, 538 échantillons de tiques ont été broyés en vue de l'extraction des ARNs et ADNs (acides désoxyribonucléiques).

### ***2.2.2. Extraction des Acides nucléiques des échantillons de tiques***

L'extraction des acides nucléiques (ARNs et ADNs) a été réalisée à l'aide de la plateforme d'extraction automatique Biomek4000 et du Kit NucleoSpin® 96 virus Core kit (Macherey-Nagel). Cette méthode permet l'extraction simultanée de 96 échantillons en plaque 96 puits. Afin de vérifier la qualité de l'extraction, des contrôles ont été ajoutés à chaque plaque d'extraction, incluant un témoin négatif, correspondant à du PBS1X, et un contrôle positif, composé d'un mélange de 90  $\mu\text{L}$  de culture de bactéries *Escherichia coli* diluée au  $30\,000^{\text{ème}}$  et de 90  $\mu\text{L}$  de culture du virus de la maladie de Newcastle titrant  $10^7$  TCID50/ml, inactivé et

dilué au 100<sup>ème</sup>. Au final, les acides nucléiques ont été élués avec 150 µL d'eau RNase free, et les échantillons ont été conservés à -80°C pour future utilisation.

### ***2.2.3. Traitement à la DNase des Acides nucléiques extraits***

5 µL de chacun des 538 échantillons d'acides nucléiques extraits ont été récupérés et ensuite regroupés pour former un seul échantillon. Un traitement DNase de l'échantillon d'ARNs a été réalisé à l'aide du kit TURBO DNA-free™, selon le protocole du fournisseur. Finalement, l'échantillon d'ARNs groupés a été envoyé à Paris à l'Institut Pasteur en vue du séquençage.

## **2.3. Séquençage de nouvelle génération (NGS): RNAseq**

### ***2.3.1. Rétro-transcription des ARNs***

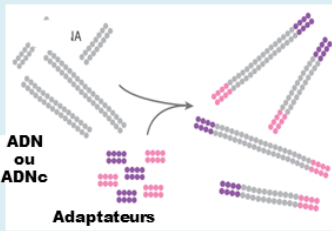
La quantité ainsi que l'intégrité des ARNs (RIN) ont été évalués à l'aide d'un NanoDrop et d'un Bioanalyzer 2100 (Agilent). Les ARNs ont ensuite été rétro-transcrits puis ont subi une amplification aléatoire à l'aide du kit QuantiTect whole transcriptome kit (Qiagen) (Vayssier *et al.*, 2013 ; Cheval *et al.*, 2011).

### ***2.3.2. Séquençage : RNAseq Illumina Hiseq2000***

Le séquençage des ARNs extraits des tiques de Guadeloupe et de Martinique a été sous-traité en Belgique à la compagnie DNAVision. Le séquençage de type RNAseq basé sur la technologie Illumina, a été réalisé à l'aide du séquenceur Hiseq2000 afin d'obtenir des lectures (« reads ») de 101 nt, lus dans les deux sens (« paired-end ») et une profondeur de lecture de 100 Mio. La Figure 3 représente une vue d'ensemble du processus de séquençage Illumina.

# Vue d'ensemble du Séquençage Illumina

## Préparation de la librairie

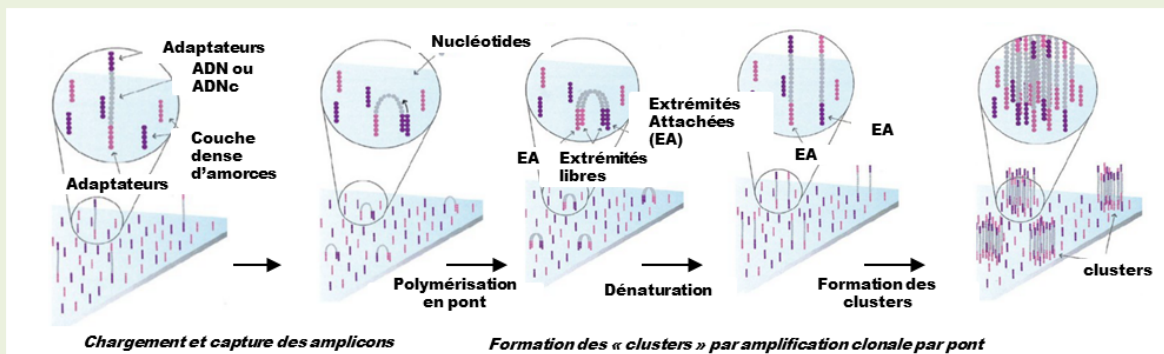


### Principe:

- Fragmentation aléatoire de l'ADN ou des ADNc
- Ligation des adaptateurs en 5' et 3'
- Amplification par PCR (ciblant les adaptateurs)
- Purification des Amplicons
- Contrôle qualité

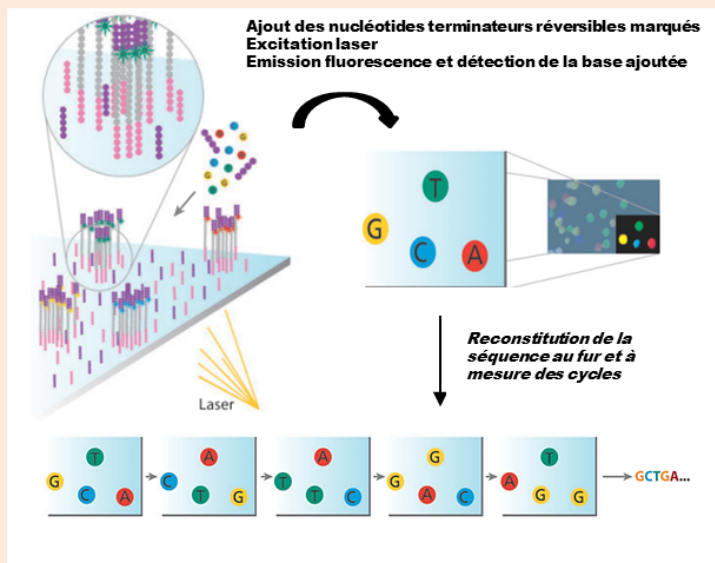
## Formation des « clusters »

- Chargement des amplicons sur la cellule de séquençage qui est recouverte d'amorces complémentaires des séquences adaptateurs
- Capture des amplicons par hybridation des adaptateurs aux amorces de surface de la cellule
- Amplification clonale par pont, en « clusters » de chaque amplicons: formation des groupes prêts au séquençage



## Séquençage

RNAseq: Illumina HiSeq2000, technologie SBS (séquençage par synthèse)



### Principe SBS:

#### 1<sup>er</sup> cycle de séquençage:

- ajout des amorces, de l'ARN polymérase, et des quatre nucléotides terminateurs réversibles marqués. Ces nucléotides présentent un fluorochrome spécifique du type de base, et un groupe chimique OH en 3' qui bloque la polymérisation lorsque le nucléotide est ajouté.
- Excitation par un laser
- Emission de la fluorescence par les nucléotides marqués: la longueur d'onde et l'intensité du signal permet l'identification de la base ajoutée
- Levée du blocage (suppression du groupe chimique bloqueur)

Les cycles suivant de polymérisation continue de la même façon, et ainsi de suite jusqu'à obtention de la séquence finale.

Figure 4. Vue d'ensemble du séquençage Illumina, figure réalisée à partir des données disponibles sur le site internet Illumina, et Mardis *et al.*, 2008.

### **2.3.3. Traitement des données de séquençage**

#### **2.3.3.1. Traitement et nettoyage des données brutes**

Le traitement et nettoyage des données brutes issues du séquençage ont été réalisés en collaboration avec Liza Al-Shikhley, ingénieure en bio-informatique de l'INRA. La Figure 4 présente les différentes étapes du contrôle de qualité et du nettoyage des reads. En sortie du séquençage nous avons obtenu deux fichiers, R1 et R2, chacun incluant 41 696 475 séquences. Nous avons obtenus deux fichiers, car les reads ont été séquencés dans les deux sens de lecture. Suite aux différentes étapes de nettoyage des données, les reads restants ont été alignés sur le génome de *Rhipicephalus microplus*, disponible dans la base de données GenBank du NCBI. Cette étape permet d'éliminer une partie des reads correspondant à des séquences génomiques de la tique, et ainsi d'enrichir la fraction des séquences qui correspondraient au microbiome de la tique. Finalement, les 13 981 874 reads restants ont été utilisés pour un assemblage *de novo*, et 27 544 contigs ont été obtenus.

#### **2.3.3.2. Attribution taxonomique des contigs**

L'attribution taxonomique des contigs a été réalisée par un alignement et une recherche d'identité de séquences à partir des bases de données nucléotidiques du NCBI, à l'aide de l'algorithme blastn (Basic Local Alignment Search Tool). Les séquences contigs ont été assignées à la taxonomie connue la plus proche en fonction de leur pourcentage d'identité de séquence.

Suite à l'assignation des contigs, les séquences associées à des bactéries, parasites, virus associés aux tiques ont été sélectionnées pour analyse complémentaire.

## Analyse des données de séquençage

Deux fichiers de données brutes de séquençage (format FASTq)

R1 (lecture sens): 41 696 475 séquences « reads »

R2 (lecture antisens): 41 696 475 séquences « reads »

Contrôle de qualité des données

Outil: FastQC

Nettoyage des données

Outil: Cutadapt, Fastx-toolkit

- Elimination des adaptateurs et amorces
- Elimination des séquences de mauvaise qualité  
Nombre de séquences restantes:  
R1: 39 982 006  
R2: 37 003 924
- Elimination des extrémités 3' de mauvaise qualité  
Nombre de reads restant:  
R1: 39 982 006  
R2: 36 682 268
- Appariement des séquences  
R1 appariées : 36 438 568  
R2 appariées : 36 438 568  
Nombre de séquences non appariées : 2 966 079

Elimination des séquences qui correspondent au génome de l'hôte

Outil « Bowtie2 »

- Alignement des séquences sur le génome de référence de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
- Elimination des séquences qui se sont alignées et qui correspondent au génome de l'hôte

Nombre de séquences restantes:

R1 appariées : 6 791 310

R2 appariées : 6 791 310

Nombre de séquences non appariées : 399 254

Assemblage *de novo*

Outil « CLC assembler »

Nombre de séquences obtenues: 27 544 «contig »

Alignement des contigs sur la base de données nucléotidique du NCBI

Outil: Blastn, NCBI

Assignment taxonomique des séquences « contig »

Figure 5. Etapes de traitement et de nettoyage des données brutes de séquençage.

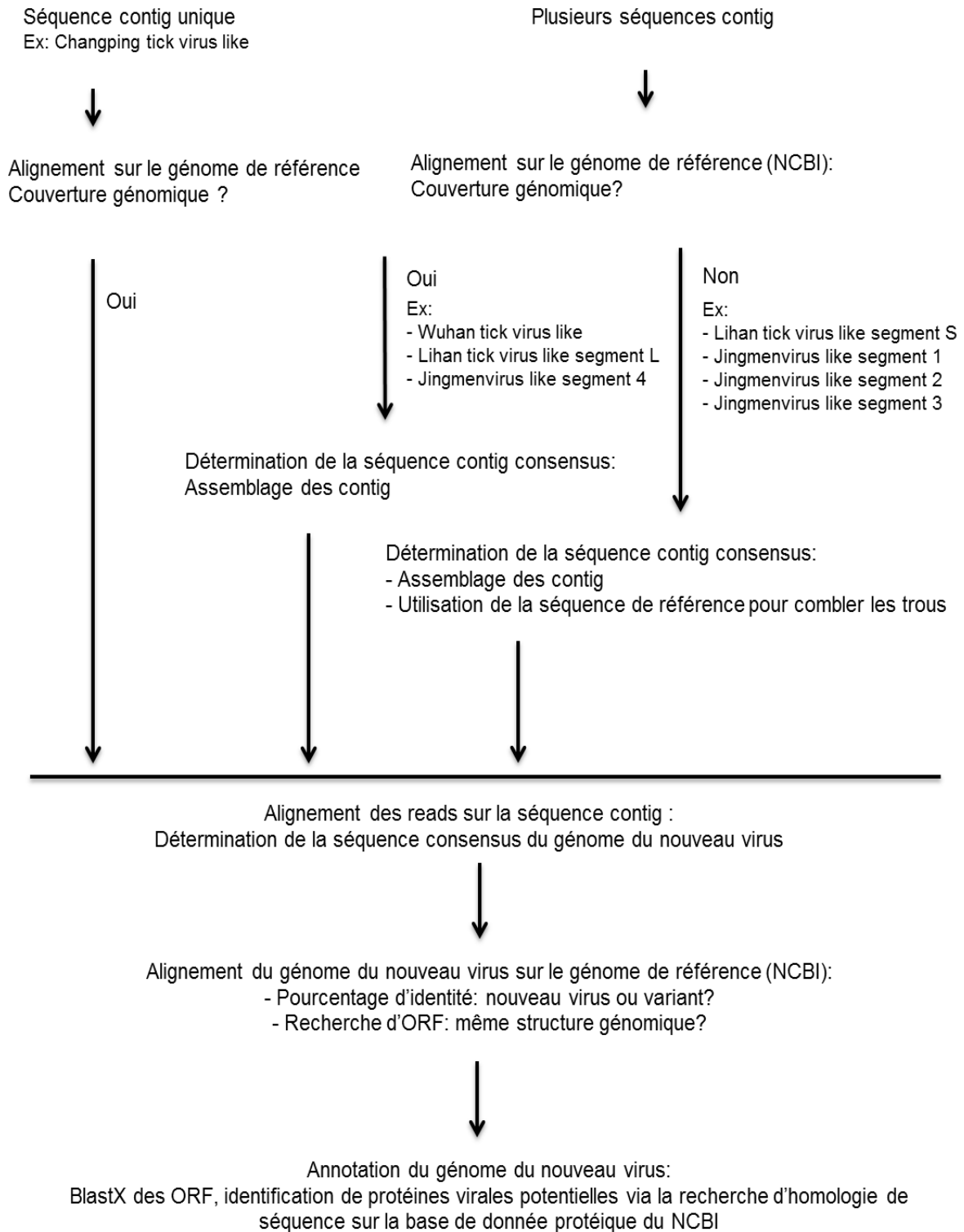


## **2.4. Analyse des génomes viraux détectés en NGS**

L'analyse des séquences contigs d'origine virale a permis l'identification de quatre virus associés aux tiques. J'ai nommé les quatre virus en fonction des virus de référence les plus proches identifiés en blastn, en y accolant le suffixe « -Like » : le Changping tick virus-Like, le Wuhan tick virus-Like, le Lihan tick virus-Like et enfin le Jingmenvirus-Like.

Pour chacun des virus, la reconstruction de leur génome a été réalisée à l'aide du logiciel Geneious (version R10), en utilisant les séquences contigs et également les reads individuels. La Figure 5 donne une vision d'ensemble des différentes étapes mises en place pour la reconstruction génomique des virus identifiés en NGS. La première étape a été d'estimer la couverture génomique obtenue grâce à la/aux séquence(s) contig(s). Pour cela les contigs spécifiques de chaque virus ont été alignés sur le génome de référence du virus le plus proche identifié en blastn. Dans le cas du Changping tick virus-Like, un seul contig a permis de couvrir entièrement le génome de référence. Dans le cas des trois autres virus, plusieurs contigs s'alignaient sur le génome de référence, j'ai donc réalisé un assemblage des séquences contigs afin de créer une séquence consensus des séquences contigs couvrant le génome de référence. Dans le cas de portion génomique non couverte par la séquence consensus contig, la portion correspondante sur le génome de référence a été utilisée pour combler l'espace et ainsi permettre l'alignement des reads lors de l'étape suivante. Une fois la séquence contig consensus obtenue, j'ai cherché à valider la représentativité de la séquence. Pour cela j'ai repris les séquences des 13 981 874 reads obtenus avant assemblage en contigs et je les ai alignés sur la séquence contig consensus. Suite aux résultats de l'alignement, en sélectionnant les bases les plus représentées dans l'alignement, j'ai pu déterminer la nouvelle séquence consensus correspondant à la séquence du génome viral présent au sein de nos échantillons de tique. La séquence génomique virale ainsi déterminée a été de nouveau alignée sur la séquence génome de référence afin d'évaluer un pourcentage d'identité, et afin de rechercher les cadres ouverts de lecture « ORF » (open reading frame). Les ORF de taille supérieure à 150 bases, et avec un codon de départ de type ATG ont été sélectionnées puis analysées par l'algorithme blastx du NCBI afin de déterminer la présence de gènes putatifs.

### Reconstruction génomique (Geneious R10)



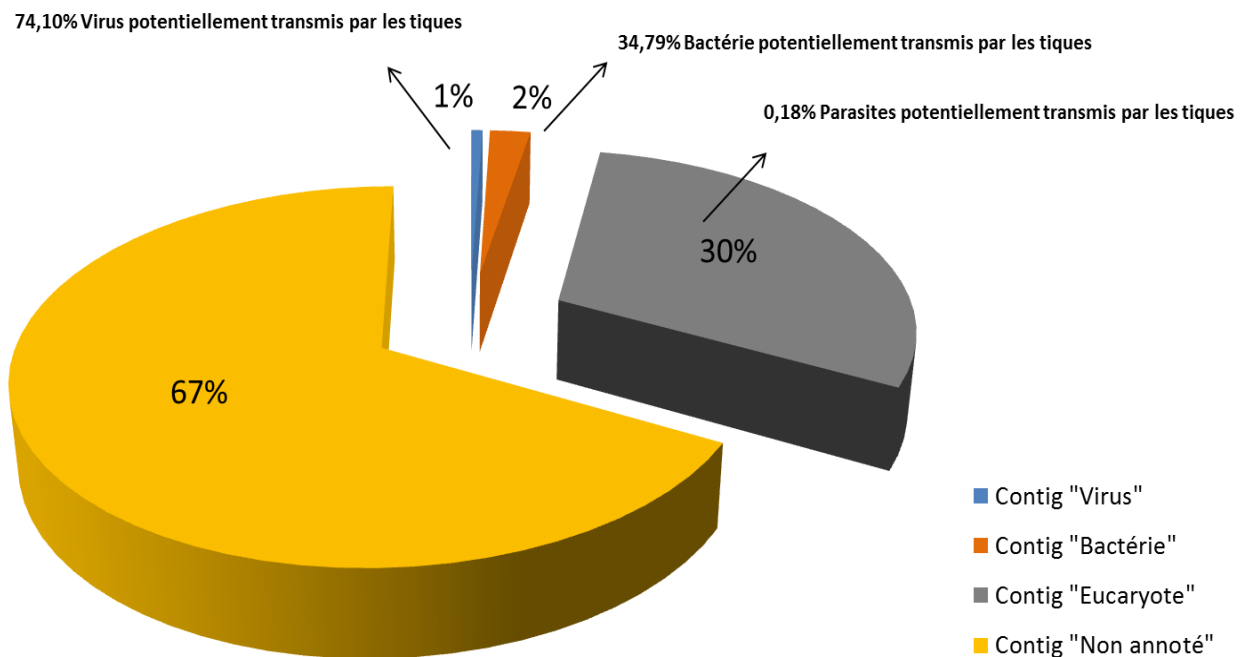
**Figure 5. Etapes de reconstruction génomique des virus identifiés en NGS (Geneious, R10).**

### **3. Résultats**

#### **3.1. Description générale des données de séquençage**

Parmi les 27 544 contigs obtenus, la majorité des séquences n'ont pas été assignées représentant 67% de séquences (soit 18 497 contigs) d'origine inconnue. Finalement, parmi les séquences annotées, environ 1% sont d'origine virale (166 contigs), 2% d'origine bactérienne (595 contigs) et 30% d'origine eucaryote (8 286) (Figure 6).

A partir des annotations obtenues, j'ai recherché les séquences appartenant à des genres bactériens, parasitaires et viraux transmis par les tiques (Figure 6). Environ 74% des contigs d'origine virale sont associés à des séquences de virus retrouvés dans les tiques (123 contigs) ; près de 34% des contigs bactériens ont été associés à des genres bactériens transmis ou présents dans les tiques (207 contigs) ; et finalement, environ 0,18% des contigs eucaryotes correspondent à des séquences de parasites transmis par les tiques (15 contigs).



**Figure 6. Assignment taxonomique des contigs assemblés issus du séquençage des ARNs des tiques de Guadeloupe et de Martinique.**

### **3.2. Inventaire des séquences d'origine bactérienne d'importance médicale et vétérinaire**

Le contenu bactérien inclus 595 contigs, parmi lesquelles 207 séquences ont pu être associées à des bactéries d'importance médicale et vétérinaire transmises par les tiques. Cinq genres bactériens ont ainsi été identifiés, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Coxiella* et *Rickettsia* (Tableau 1). Les critères d'identification au niveau de l'espèce bactérienne correspondent à un pourcentage d'identité des contigs supérieur ou égal à 95%, et à une démarcation nette par rapport à une autre espèce proche (Tableau 2). Toutefois, d'une façon générale, la longueur souvent trop courte des contigs, ainsi que les gènes identifiés, généralement très conservés au sein des différents genres bactériens, n'ont pas permis une identification claire des bactéries au niveau de l'espèce.

**Tableau 1 : Nombre de contigs présentant une identité de séquences avec des bactéries habituellement transmises par les tiques.**

Assignation taxonomique des contigs	Nombre de contig
Contigs total assemblés	27544
Contigs "Bacteria"	595
Contigs "Bacteria transmis par les tiques"	207
Contigs <i>Anaplasma</i> spp.	16
Contigs <i>Ehrlichia</i> spp.	7
Contigs <i>Borrelia</i> spp.	13
Contigs <i>Coxiella</i> spp.	43
Contigs <i>Rickettsia</i> spp.	128

#### ***3.2.1. Séquences contigs appartenant au genre *Anaplasma****

Parmi les seize séquences contigs qui ont présenté des identités de séquence avec des espèces bactériennes appartenant au genre *Anaplasma*, seulement deux et un contigs ont permis respectivement l'identification d'*Anaplasma marginale* (100% d'identité) et d'*Anaplasma phagocytophilum* (96% d'identité) (Tableau 2). *Anaplasma marginale* est un agent pathogène de bovin, endémique dans les Caraïbes et transmis par *Rhipicephalus microplus*, sa présence au sein de notre échantillon est donc tout à fait attendue (Camus and Montenegro-James, 1994; Camus and Barre, 1995). Cependant, une des séquences contig ayant permis l'identification d'*A. marginale* présente également un fort pourcentage d'identité pour *A.*

*centrale* (99%). *A. centrale* est phylogénétiquement très proche d'*A. marginale*, mais n'est que faiblement pathogène pour le bovin, et est généralement utilisé dans la fabrication de vaccin vivant atténué contre l'anaplasmose bovine (Rymaszewska and Grenda, 2008). *A. centrale* n'a pas été rapporté dans les Caraïbes. Toutefois, la détection d'*A. marginale* est généralement basée sur des études de microscopie et de sérologie, qui peuvent entraîner des erreurs d'identification entre ces deux espèces proches (Molad *et al.*, 2006). Ainsi, on ne peut exclure la possible présence d'*A. centrale* dans notre échantillon. *Anaplasma phagocytophilum* n'a jamais été décrit dans les Antilles Françaises, bien que sa présence ait été suspectée mais non démontrée à Puerto Rico et Grenade (Yabsley 2008; McCown *et al.*, 2013). *Anaplasma phagocytophilum* est un agent pathogène capable d'infecter une large gamme d'hôte vertébré, les souches américaines sont généralement pathogènes pour l'Homme, alors que les souches européennes sont pathogènes chez l'animal, notamment le bovin (Dugat *et al.*, 2015). La séquence contig *A. phagocytophilum* retrouvée dans notre échantillon ne permet pas de déterminer une souche en particulier, elle présente 96% d'identité de séquence avec des portions de génome de souches provenant de différents hôtes, tels que l'Homme (CP000235.1), le rongeur (CP006617.1), le bovin (FLLR01000016.1), le mouton (CP015376.1) ou encore le chien (CP006618.1). Toutefois, une seule séquence contig a permis l'identification d'*A. phagocytophilum*, et le pourcentage d'identité de cette séquence avec *A. marginale* ou *A. centrale* est également élevé (94%). La présence réelle d'*A. phagocytophilum* dans nos échantillons doit donc être confirmée.

### 3.2.2. Séquences contigs appartenant au genre *Ehrlichia*

Parmi les sept séquences contigs présentant des identités de séquences avec des espèces bactériennes appartenant au genre *Ehrlichia*, seule une séquence permet l'identification d'une espèce. Cette séquence contig présente 97% d'identité de séquence pour 99% de couverture avec la séquence du gène de l'ARNr 23S de l'agent *Ehrlichia muris*-like (KP702294.1) (Tableau 2). *Ehrlichia muris* affecte généralement les rongeurs, cependant l'agent *Ehrlichia muris*-like a été récemment décrit aux USA comme pathogène pour l'homme et transmis par les tiques *Ixodes scapularis* (Lynn *et al.*, 2015). Une fois de plus une seule séquence contig a permis l'identification de cet agent pathogène, et s'agissant d'une portion de l'ARNr 23S qui est très conservé au sein des *Ehrlichia*, la détection pour la première fois de *Ehrlichia muris* (ou *Ehrlichia muris*-like) dans les Caraïbes doit être confirmée.

Parmi les séquences *Ehrlichia*, on peut noter l'absence de séquence permettant l'identification d'*Ehrlichia ruminantium* au sein de notre échantillon, qui est pourtant un agent pathogène de bovins circulant dans la région. En 2003, *E. ruminantium* avait été détecté dans 36,7% (51 sur 139) des tiques *A. variegatum* collectées en Guadeloupe (Vachier *et al.*, 2008). Sachant que l'échantillon analysé dans cette étude en séquençage inclus les ARNs de 158 spécimens d'*A. variegatum* collectés en Guadeloupe, il est très surprenant de ne pas retrouver de séquences appartenant à *E. ruminantium*.

### **3.2.3. Séquences contigs appartenant au genre *Rickettsia***

Les séquences contigs appartenant au genre *Rickettsia* sont les plus nombreuses. Parmi les 128 séquences contigs, 59 permettent l'identification nette de *Rickettsia africae* et une séquence, de seulement 100 nt, suggère une possible présence de *Rickettsia philipii* (Tableau 2). *Rickettsia africae* est un agent pathogène humain, responsable de la fièvre africaine à tique, généralement asymptomatique ou induisant des symptômes bénins chez le patient. Dans les Caraïbes, malgré une prévalence élevée retrouvée dans les sera humains et animaux étudiés, un seul cas d'infection humaine a été répertorié en Guadeloupe (Parola *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2009; Kelly *et al.*, 2003; 2010a). Environ 29% des séquences contigs associées aux bactéries transmises par les tiques ont permis d'identifier *Rickettsia africae*, suggérant un taux élevé d'infection des tiques des Antilles Françaises par ce microorganisme. *Rickettsia philipii* est également un agent pathogène humain décrit aux USA où il est transmise par *Dermacentor occidentalis* (Padgett *et al.*, 2016). Son identification au sein de nos échantillons de tique reste à établir, étant donné que la séquence permettant l'assignation ne fait que 100 nt, et que le taux d'identité de séquence reste élevé pour d'autre *Rickettsia*, comme *Rickettsia africae* (99% d'identité de séquence, CP001612.1), dont la présence est la plus probable.

### **3.2.4. Séquences contigs appartenant au genre *Borrelia***

Parmi les treize séquences contigs présentant des identités de séquences avec des espèces bactériennes appartenant au genre *Borrelia*, quatre séquences permettent l'identification de *Borrelia miyamotoi* et deux de *Borrelia theileri* (Tableau 2). Ces deux *Borrelia* font partie du groupe des fièvres récurrentes, avec la particularité d'être transmises par des tiques dures

(Cutler *et al.*, 2017). *Borrelia miyamotoi* est un agent pathogène de l'homme, essentiellement distribué dans l'hémisphère nord, et transmis par les tiques du genre *Ixodes* (Kraus *et al.*, 2015). *Borrelia theileri* est un agent pathogène des ruminants retrouvé essentiellement dans l'hémisphère sud, et transmis par les tiques dures du genre *Rhipicephalus*, tel que *Rhipicephalus microplus* (Smith *et al.*, 1978 ; McCoy *et al.*, 2014). La présence inattendue de bactérie du genre *Borrelia* nécessite de plus amples confirmations.

### 3.2.5. Séquences contigs appartenant au genre *Coxiella*

Parmi les quarante-trois séquences contigs associées au genre *Coxiella*, quarante et une sont des séquences de *Coxiella* like-endosymbiontes (CLEs). Les bactéries endosymbiotes appartenant au genre *Coxiella* sont couramment retrouvées chez plusieurs espèces de tiques, et ont déjà été décrite chez *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus*, les deux espèces qui composent notre échantillon (Andreotti *et al.*, 2011 ; Ahantarig *et al.*, 2013 ; Duron *et al.*, 2015a,b). Les CLEs semblent être des endosymbiontes bénéfiques pour la tique, généralement hérités de la mère via le cytoplasme des œufs, agissant positivement sur leur fitness (approvisionnement en vitamines, nutriments, etc...). Ils sont considérés comme non pathogènes. Les CLEs composent un groupe génétiquement très divers, formant plusieurs clades en fonction de l'espèce de tique hôte (Duron *et al.*, 2015a). Leur présence au sein de notre échantillon n'est donc pas inattendue. En plus des CLEs, deux séquences contigs présentent 98 et 95% d'identité de séquence avec les séquences de l'ARNr 23S de l'agent pathogène génétiquement proche des CLEs, *Coxiella burnetii* (Tableau 2). *C. burnetii* est un agent pathogène humain responsable de la fièvre Q, une maladie essentiellement transmise par l'air mais pouvant être transmise également par les tiques, notamment *Rhipicephalus microplus* qui est un vecteur suspecté (Duron *et al.*, 2015b). *C. burnetii* semble être issu de l'évolution de CLE, issus de tique molle, en un pathogène spécialisé des vertébrés (Duron *et al.*, 2015a). L'identification de *C. burnetii* dans notre échantillon d'ARN de tique de Guadeloupe et de Martinique est inattendue, d'autant qu'aucun cas de Fièvre Q n'a été répertorié jusqu'à présent dans la zone. De plus, la distinction génétique basée sur l'analyse d'un seul gène entre *C. burnetii* et les CLEs peut générer des erreurs d'interprétation et d'identification (Duron *et al.*, 2015b). Sachant que les séquences contigs associées à *C. burnetii* partagent également 94 et 96% d'identité de séquence avec les ARNr 23S de CLEs, la présence d'endosymbiontes semble plus probable que celle de l'agent pathogène.

Tableau 2 : Liste des bactéries d'importance médicale et vétérinaire identifiées au niveau de l'espèce dans les tiques, incluant la description des contigs ayant permis l'assignation taxonomique, la liste des gènes identifiés et les espèces bactériennes les plus proches. (NA : Numéro d'accension ; %id : pourcentage d'identité ; %C : pourcentage de couverture ; CLE : *Coxiella like endosymbionte*).

Espèce identifiée	NA	Nom contig	% id	% c	Longueur contig	gène cible	Espèce proche	% id	% c	NA
<i>Anaplasma marginale</i>	CP000030	contig_16105	100	100	119	génom complet	<i>A. centrale</i>	82	100	CP001759
	NR_076579.1	contig_5301	100	100	108	23S ARNr	<i>A. centrale</i>	99	100	NR_076686.1
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	NR_076399.1	contig_155	96	100	187	23S ARNr	<i>A. marginale</i> / <i>A. centrale</i>	94	100	NR_076579.1 / NR_076686.1
<i>Ehrlichia muris</i>	KP702294	contig_1568	97	99	275	23S ARNr	<i>E. canis</i>	96	99	NR_076375
<i>Borrelia miyamotoi</i>	NR_121951.1	contig_12510	100	100	148	23S ARNr	<i>Borrelia</i> spp.	99	100	CP019767.1
	NR_121951.1	contig_324	97	100	155	23S ARNr	<i>B. coriaceae</i>	96	100	NR_121982.1
	NR_121951.1	contig_325	98	97	642	23S ARNr	<i>B. anserina</i>	97	97	CP013704.1
	NR_121951.1	contig_9638	99	100	136	23S ARNr	<i>Borrelia</i> spp.	96	100	NR_121982.1
<i>Borrelia theileri</i>	KF569941	contig_1741	100	100	115	16S ARNr	<i>Borrelia</i> spp.	99		KU749376.1
	DQ872186	contig_654	100	100	392	16S ARNr	<i>Borrelia</i> spp.	99	100	AY166715.1
<i>Coxiella burnetii</i>	NR_076084.3	contig_1109	95	100	195	23S ARNr	CLE	94	100	CP011126
	NR_131209.1	contig_309	98	100	168	23S ARNr	CLE	96	100	CP011126
<i>Rickettsia africae</i>	CP001612	contig_904	100	100	195	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003341.1
	CP001612	contig_9089	100	100	167	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003375.1
	CP001612	contig_9620	100	98	109	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	98	CP018914.1
	CP001612	contig_9866	100	100	152	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	99	CP003341.1
	CP001612	contig_10178	100	100	116	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP019435.1
	CP001612	contig_10247	100	100	240	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003375.1
	CP001612	contig_10734	100	99	133	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	99	AP017602.1
	CP001612.1	contig_11527	100	100	147	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	99	CP003375.1
	CP001612	contig_11859	100	98	171	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	98	CP003375.1
	CP001612	contig_12064	100	100	127	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003375.1
	CP001612	contig_12112	100	100	429	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	AE006914.1
	CP001612	contig_12176	100	100	204	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003341.1



<i>Espèce identifiée</i>	NA	Nom contig	% id	% c	Longueur contig	gène cible	<i>Espèce proche</i>	% id	% c	NA
<i>Rickettsia africae</i>	CP001612.1	contig_13230	100	100	149	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	89	100	CP015010.1
	CP001612	contig_13785	100	100	117	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP019435.1
	CP001612	contig_14379	100	100	121	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003341.1
	CP001612	contig_1497	100	98	128	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	98	99	CP001227.1
	CP001612	contig_14974	100	100	181	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003341.1
	CP001612	contig_154	100	100	2748	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003341.1
	CP001612	contig_15458	100	100	135	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003341.1
	CP001612	contig_15641	100	99	110	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	98	100	CP003341.1
	CP001612	contig_1762	100	100	177	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003375.1
	CP001612	contig_18262	100	100	223	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003341.1
	CP001612	contig_1874	100	100	227	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	98	100	CP003341.1
	CP001612	contig_19446	100	100	108	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP015012.1
	CP001612	contig_20648	100	99	132	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	99	CP003341.1
	CP001612	contig_22125	100	100	177	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003375.1
	CP001612	contig_23584	100	100	168	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	99	CP018914.1
	CP001612	contig_23906	100	99	138	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	99	CP003375.1
	CP001612	contig_24299	100	100	145	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003375.1
	CP001612	contig_24407	100	100	125	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003375.1
	CP001612	contig_24593	99	100	176	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	99	CP003375.1
	CP001612	contig_25776	100	99	145	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	97	CP003341.1
	CP001612	contig_27192	100	100	168	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP018914.1
	CP001612	contig_27352	100	100	126	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003341.1
	CP001612	contig_3382	99	100	140	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP019435.1
	CP001612	contig_3546	99	100	286	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	98	100	CP003308.1
	CP001612	contig_4633	100	100	102	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP019435.1
	CP001612	contig_5310	100	100	339	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003375.1
	CP001612	contig_569	100	100	155	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003341.1
	CP001612	contig_681	99	100	770	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	97	100	CP003341.1

<i>Espèce identifiée</i>	NA	Nom contig	% id	% c	Longueur contig	gène cible	<i>Espèce proche</i>	% id	% c	NA
<i>Rickettsia africae</i>	CP001612	contig_717	100	100	170	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP019435.1
	CP001612	contig_7831	100	100	138	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003341.1
	CP001612	contig_8093	100	100	109	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	AP017602.1
	KF660531.1	contig_11055	99	100	219	ompA	<i>Rickettsia</i> spp.	97	100	U83437.1
	AF123706.1	contig_11313	100	100	263	ompB	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP003341.1
	AF123706	contig_3989	100	100	173	ompB	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	MF002508.1
	AF123706	contig_4690	100	100	199	ompB	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	JX101599.1
	AF123706	contig_4999	99	100	252	ompB	<i>Rickettsia</i> spp.	98	100	KY113111.1
	AF123706	contig_9705	100	100	214	ompB	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	AF123712.1
	AF123706	contig_9706	98	100	114	ompB	<i>Rickettsia</i> spp.	97	100	KY113111.1
	CP001613	contig_4249	100	100	976	plasmide pRAF	<i>Clostridium</i> spp.	76	10	CP004121.1
	CP001613.1	contig_10043	100	100	339	plasmide pRAF	<i>R. raoultii</i>	97	100	CP010971.1
	CP001613	contig_11310	99	100	246	plasmide pRAF	<i>R. raoultii</i>	99	94	CP010971.1
	CP001613.1	contig_15491	100	99	174	plasmide pRAF	<i>Rickettsia</i> spp.	79	40	AE017226.1
	CP001613	contig_19003	100	100	180	plasmide pRAF	<i>Rickettsia</i> spp.	95	91	CP010971.1
	CP001613	contig_22488	99	100	159	plasmide pRAF	<i>Rickettsia</i> spp.	83	77	EF564599.1
	CP001613.1	contig_24948	100	99	103	plasmide pRAF	<i>Rickettsia</i> spp.	95	99	CP010971.1
	CP001613	contig_8433	100	100	112	plasmide pRAF	<i>R. raoultii</i>	96	100	CP010971.1
	CP001613	contig_8751	100	100	103	plasmide pRAF	<i>R. asemboensis</i>	92	48	CP011517.1
<i>Rickettsia philipii</i>	CP003308.1	contig_20078	100	100	129	génom complet	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	CP001612.1

### **3.3. Inventaire des séquences d'origine parasitaire d'importance médicale et vétérinaire**

Le contenu parasitaire inclut 15 séquences contigs parmi lesquelles 8 286 séquences assignées aux eucaryotes. Deux genres parasites ont ainsi été identifiés, *Babesia* (12 contigs) et *Theileria* (3 contigs) (Tableau 3). Les critères d'identification au niveau de l'espèce parasitaire correspondent à un pourcentage d'identité des contigs supérieur ou égal à 95%, et à une démarcation nette par rapport à une autre espèce proche.

**Tableau 3 : Nombre de contigs présentant une identité de séquences avec des parasites habituellement transmis par les tiques.**

Assignment taxonomique des contigs	Nombre de contig
Contigs total assemblés	27544
Contigs "Eucaryotes"	8286
Contigs "Parasites transmis par les tiques"	15
Contigs <i>Babesia</i> spp.	12
Contigs <i>Theileria</i> spp.	3

Les genres parasites identifiés appartiennent au phylum des Apicomplexa et à la sous classe des piroplasmides. La longueur des contigs variant de 102 à 622 nt et les séquences génomiques représentées étant essentiellement des séquences conservées, l'identification au niveau de l'espèce reste difficile. En respectant les critères d'identification seules les 12 séquences contigs appartenant au genre *Babesia* permettent l'identification nette de *Babesia bigemina* (Tableau 4). *Babesia bigemina* est un agent pathogène de bovin, endémique dans les Caraïbes et transmis par *Rhipicephalus microplus*, sa présence au sein de notre échantillon est donc tout à fait attendue (Camus and Montenegro-James, 1994; Camus and Barre, 1995). Parmi les trois séquences contigs assignées *Theileria* spp., nous n'avons pas pu déterminer la (ou les) espèce(s) de *Theileria* présente(s) dans nos échantillons, les séquences de l'ARNr 28S identifiées étant trop conservées au sein du genre.

**Tableau 4 : Tableau récapitulatif des séquences contigs et assignation ayant permis l'identification du parasite pathogène *Babesia bigemina*. (NA : Numéro d'accèsion ; %id : pourcentage d'identité ; %C : pourcentage de couverture).**

<i>Espèce identifiée</i>	NA	Nom contig	% id	% c	Longueur contig	gène cible	<i>Espèce proche</i>	% id	% c	NA
<i>Babesia bigemina</i>	JN391440	contig_11404	99	100	137	28S ARNr	<i>Babesia ovata</i>	74	100	JN391436.1
	DQ301768	contig_140	100	100	152	ITS	<i>Babesia ovata</i>	99	100	EF422218.1
	LK391708	contig_17392	100	100	130	Chromosome II	<i>Babesia divergence</i>	93	100	LK934714.1
	LK391708	contig_2034	99	100	622	Chromosome III/II	<i>Babesia divergence</i>	82	100	LK935835.1
	LK391709	contig_23949	99	99	117	Chromosome III (28S ARNr)	<i>Babesia ovata</i>	98	99	JN391430.1
	XM_012913513	contig_24949	100	100	102	hsp70	<i>Babesia caballi</i>	92	100	AB159783.1
	JN391440.1	contig_2652	99	98	404	28S ARNr	<i>Babesia ovata</i>	98	98	JN391430.1
	LK391709	contig_5614	98	100	136	Chromosome III/II	<i>Babesia divergence</i>	74	99	LK934717.1
	LK391709	contig_5779	99	100	258	Chromosome III	<i>Babesia divergence</i>	85	95	LK934711.1
	LK391707	contig_6347	99	100	112	Chromosome I	<i>Anthracoystis flocculosa</i>	89	72	XM_007878520.1
	XM_012915027.1	contig_743	98	100	331	Protéine hypothétique	<i>Ovis canadensis</i>	97	100	CP011887.1

### **3.4. Inventaire des sequences d'origine virale présentes dans les tiques**

Parmi les 166 séquences contigs qui ont montré des identités de séquences avec des génomes viraux, 123 ont été sélectionnées pour leur association à des virus retrouvés dans les tiques (Tableau 5). A noter que le contrôle positif consistant en une dilution limite du virus de Newcastle incluse dans notre échantillon a été détecté avec 15 séquences contigs, montrant la détectabilité de la méthode.

**Tableau 5 : Nombre de contigs présentant une identité de séquences avec des virus associés aux tiques.**

Assignation taxonomique des contigs		Nombre de contig
Contigs total assemblé		27544
Contigs "Virus"		166
Contigs "Virus associés aux tiques"		123
Contigs Changping tick virus-Like		1
Contigs Wuhan tick virus-Like		3
Contigs Lihan tick virus-Like	Total	10
	Segment L	6
	Segment S	4
Contigs Jingmenvirus-Like	Total	109
	Segment 1	34
	Segment 2	27
	Segment 3	18
	Segment 4	31

#### ***3.4.1. Séquence contig « Changping tick virus-Like »***

Une séquence contig de 11 177 nucléotides (nt) a présenté un pourcentage d'identité de séquence globale de 60% avec le génome complet du Changping tick virus 2 (CTV). Le CTV est un nouveau virus très récemment décrit en Chine au sein d'échantillons de tique *Dermacentor* sp. appartenant à une nouvelle famille virale appelée « Chuviridae » (Li *et al.*, 2015). Le pourcentage d'identité de la séquence contig étant assez faible, ce résultat suggère

la présence d'un nouveau virus, proche du CTV, dénommé dans cette étude Changping tick virus-Like (CTVL).

#### **3.4.2. Séquences contigs « Wuhan tick virus-Like »**

Deux séquences contigs, de 109 et 11 330 nt ont présenté un pourcentage d'identité entre 94 et 95% avec le génome complet du Wuhan tick virus 2 (WTV). Le WTV est également un nouveau virus décrit en Chine au sein d'échantillons de tique *Rhipicephalus microplus* et appartenant à la famille « Chuviridae » (Li *et al.*, 2015). Le pourcentage d'identité des séquences contigs compris entre 94 et 95% suggère la présence d'un variant proche (ou génotype proche) du WTV, dénommé dans cette étude Wuhan tick virus-Like (WTVL).

#### **3.4.3. Séquences contigs « Lihan tick virus-Like »**

10 séquences contigs entre 103 et 6 394 nt ont présenté un pourcentage d'identité entre 92 et 98% avec les segments S et L du Lihan tick virus (LTV). Le Lihan tick virus a été décrit en Chine au sein d'échantillons de tique *Rhipicephalus microplus* et a été classé en tant que *Phlebovirus* (Li *et al.*, 2015). On peut noter, que similairement au LTV, aucun des contigs de notre jeu de données n'a permis d'identifier le segment M normalement retrouvé chez les *Phlebovirus*. Le pourcentage d'identité des séquences contigs compris entre 92 et 98% pour les segments L et S suggère la présence d'un variant proche (ou génotype proche) du LT, dénommé dans cette étude Lihan tick virus-Like.

#### **3.4.4. Séquences contigs « Jingmenvirus-Like »**

La majorité des séquences contigs, soit 109 contigs, avec des longueurs allant de 100 à 1 097 nt, ont présenté un pourcentage d'identité entre 74 et 90% avec les segments 1 à 4 de deux virus récemment décrits, le Jingmen tick virus et le Mogiana tick virus (JTV et MTV). Le JTV et le MTV appartiennent à un nouveau groupe viral, dénommé Jingmenvirus, qui inclut des virus à ARN, généralement à quatre segments, phylogénétiquement proches des virus non segmentés du genre *Flavivirus* (Ladner *et al.*, 2016 ; Villa *et al.*, 2017). Le JTV, a été récemment décrit en Chine (Shi *et al.*, 2016 ; Qin *et al.*, 2014), et le MTV au Brésil, tous deux au sein d'échantillons de tique *Rhipicephalus microplus* (Maruyama *et al.*, 2014 ; Villa *et al.*,

2017). Le pourcentage d'identité des séquences contigs comprise entre 74 et 90% suggère la présence d'un nouveau virus, proche à la fois du JTV et du MTV, dénommé dans cette étude Jingmenvirus-Like (JVL).

Le nombre de séquences ainsi que la couverture génomique fournis par les séquences contigs étaient suffisantes pour tenter de reconstruire les génomes viraux de ces quatre virus identifiés par séquençage.

### **3.5. Analyse et reconstruction des génomes viraux**

#### ***3.5.1. Génome du virus “Changping tick virus-Like”***

Une seule séquence contig a permis l'identification d'un nouveau virus proche du Changping tick virus 2 (CTV). 5 553 reads ont été alignés sur la séquence du contig permettant ainsi de reconstruire le génome du nouveau virus, appelé Changping tick virus-Like (CTVL). Bien que le CTVL ne partage que 55,6% d'identité de séquence nucléotidique avec le CTV (NC\_028260.1), il partage la même structure génomique, le même nombre et la même organisation des gènes, spécifique des Chuviridae (Li *et al.*, 2015) (Tableau 6). En effet, le CTVL a lui aussi un génome de type circulaire, non segmenté. Le génome du CTVL fait 11 177 nt, il est donc légèrement plus long que le génome du CTV qui fait 10 877 nt. Le génome du CTVL porte également trois ORF, dont la nature et l'ordre sont similaire au CTV. Le premier ORF codant putativement pour l'ARN polymérase ARN-dépendante, puis le second pour la glycoprotéine, et enfin le troisième pour la nucléoprotéine (Figure 7).

Les séquences ORF ont été analysées à l'aide de l'algorithme blastx, qui permet de rechercher une identité de séquence entre la séquence nucléotidique traduite d'intérêt et la base de données protéiques du NCBI (Tableau 6). L'ORF qui correspond à l'ARN polymérase du CTVL, est de même taille que celle du génome de référence, et partage 64% d'identité de séquences avec l'ARN polymérase du CTV (YP\_009177704.1). L'ORF correspondant à la glycoprotéine du CTVL, est plus longue que celle du génome de référence, et partage 61% d'identité de séquences avec la glycoprotéine du CTV (YP\_009177705.1). Finalement, l'ORF correspondant à la nucléoprotéine du CTVL, est également plus longue que celle du génome de référence, et partage seulement 47% d'identité de séquences avec la

**Figure 7. Génome du Changping tick virus-Like détecté en NGS.**





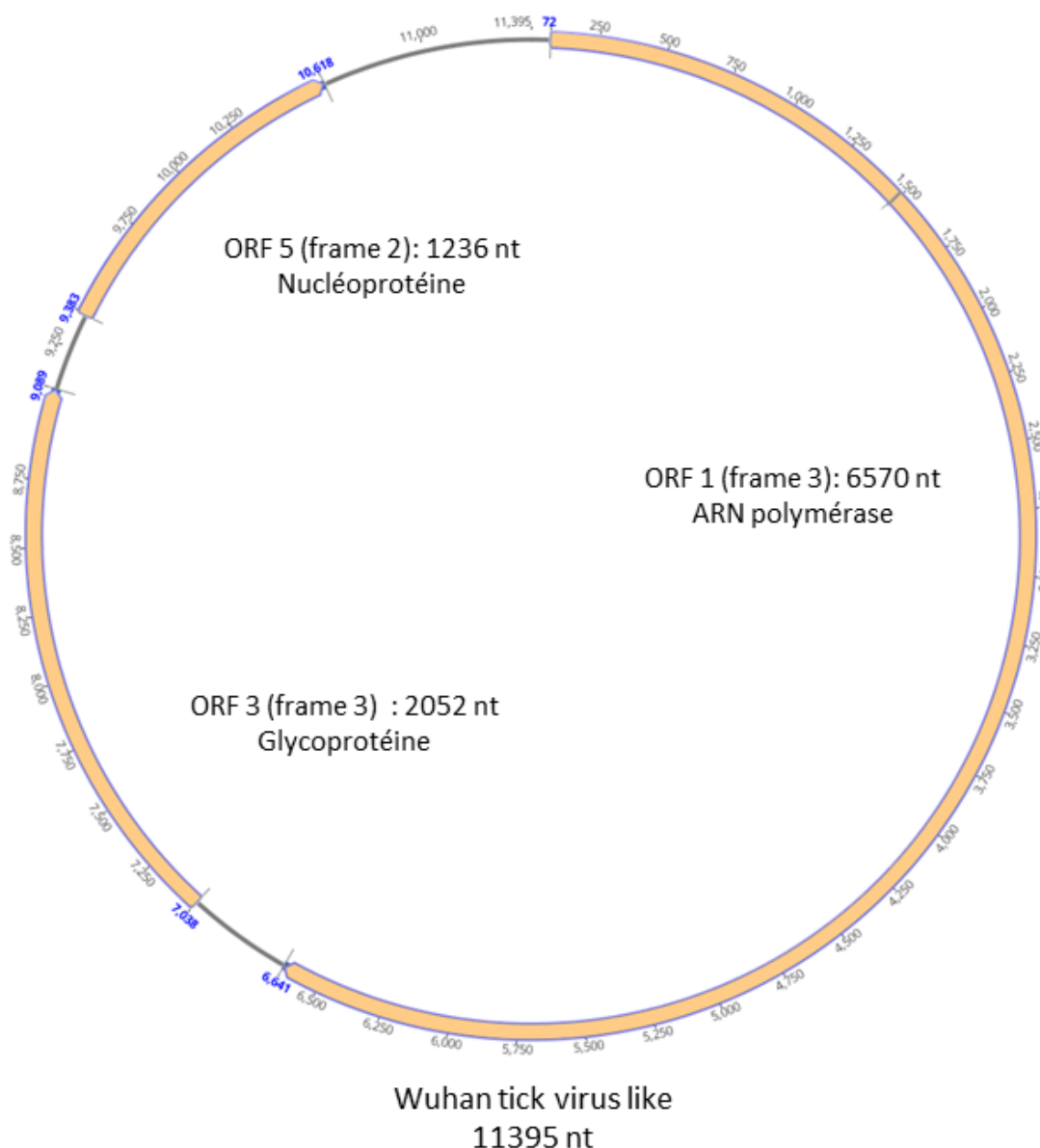
**Tableau 6 : Comparaisons des génomes et des ORF du virus Changping tick virus-Like (CTVL), détecté en NGS, et du génome de référence du Changping tick virus 2 (CTV).**

Virus		CTVL	CTV (NC_028260.1)
Génome	Nature	ARN circulaire non segmenté	ARN circulaire non segmenté
	Affiliation	Chuvirus	Chuvirus
	Taille (nt)	11177	10877
	Nombre de reads	5553	/
	% Identité (Alignement)	55,60%	
ORF	ORF ARN polymérase	Nom ORF	ORF 1 (frame 2)
		Taille (nt)	6471
		Position	59-6529
		% Identité (blastx)	64%
	ORF Glycoprotéine	Nom ORF	ORF 2 (frame 1)
		Taille (nt)	2043
		Position	6664-8706
		% Identité (blastx)	61%
	ORF Nucléoprotéine	Nom ORF	ORF 3 (frame 1)
		Taille (nt)	1428
		Position	8932-10350
		% Identité (blastx)	47%

### 3.5.2. Génome du virus “Wuhan tick virus-Like”

Trois séquences contigs ont permis l'identification d'un nouveau virus proche du Wuhan tick virus 2 (WTV). Dans un premier temps, les trois contigs ont été assemblés, puis 61 958 reads ont été alignés sur la séquence consensus contig permettant ainsi de reconstruire le génome du nouveau virus, appelé Wuhan tick virus-Like (WTVL).

Le génome du WTVL partage 94,3% d'identité de séquence nucléotidique avec le WTV (NC\_028266.1), et la taille du génome de 11 395 nt est similaire, suggérant la présence d'un variant proche (ou génotype proche) du WTV (Tableau 7). Le WTV fait lui aussi partie de la nouvelle famille des « Chuviridae » (Li *et al.*, 2015). Ainsi le WTVL présente lui aussi un génome ARN de type circulaire, avec trois ORF. Là encore la nature et l'ordre des ORF est conservée : le premier ORF codant putativement pour l'ARN polymérase ARN-dépendante, puis le second pour la glycoprotéine, et enfin le troisième pour la nucléoprotéine (Figure 8).



**Figure 8. Génome du Wuhan tick virus-Like (WTVL) détecté en NGS.**

Les séquences ORF ont été analysées à l'aide de l'algorithme blastx (Tableau 7). L'ORF qui correspond à l'ARN polymérase du WTVL partage 98% d'identité de séquences avec l'ARN polymérase du CTV (YP\_009177704.1). L'ORF correspondant à la glycoprotéine du WTVL partage également 98% d'identité de séquences avec la glycoprotéine du WTV (YP\_009177705.1). Finalement, l'ORF correspondant à la nucléoprotéine du WTVL, partage 99% d'identité de séquences avec la glycoprotéine du CTV (YP\_009177705.1). Les pourcentages d'identité de séquences protéiques très élevées entre les trois protéines du WTVL et le WTV, suggèrent là encore la présence d'un variant (ou

nouveau génotype) du CTV dans nos échantillons de tique. On peut noter que le WTV avait été retrouvé dans des tiques *Rhipicephalus microplus* en Chine, la même espèce de tique qui est présente dans nos échantillons de Guadeloupe et Martinique (Li *et al.*, 2015).

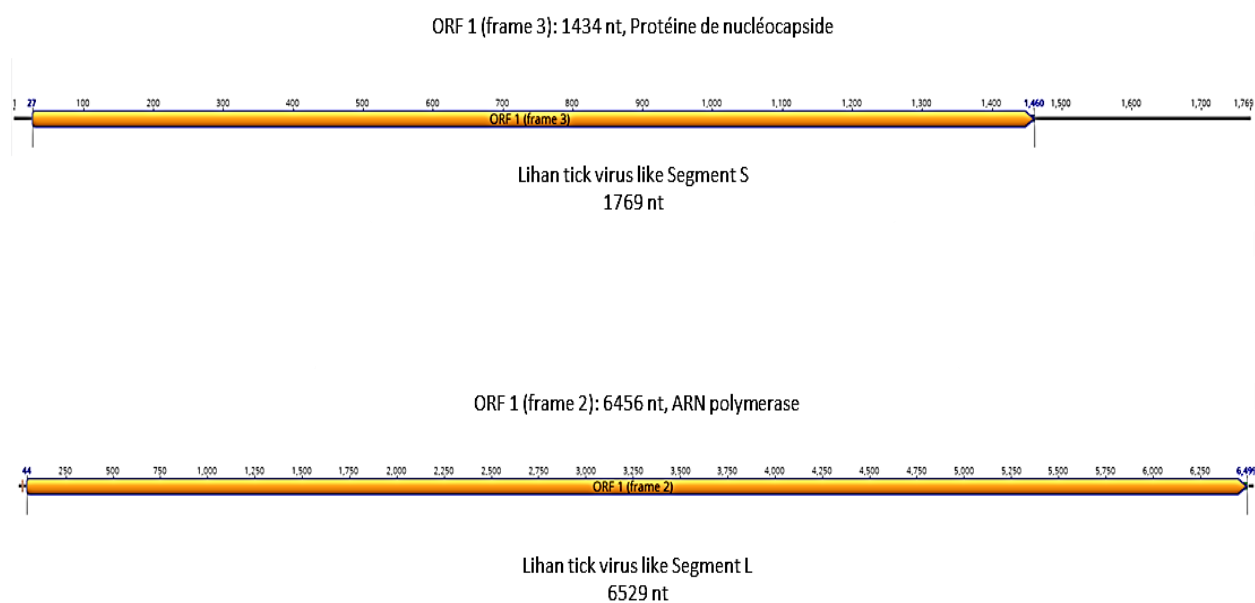
**Tableau 7 : Comparaisons des génomes et des ORF du virus Wuhan tick virus-Like (WTVL), détecté en NGS, et du génome de référence du Wuhan tick virus 2 (WTV).**

Virus		WTVL	WTV (NC_028266.1)
Génome	Nature	ARN circulaire non segmenté	ARN circulaire non segmenté
	Affiliation	Chuvirus	Chuvirus
	Taille (nt)	11395	11395
	Nombre de reads	61958	/
	% Identité (Alignement)	94,3%	
ORF	ORF ARN polymérase	Nom ORF	ORF 1 (frame 3)
		Taille (nt)	6570
		Position	72-6641
		% Identité (blastx)	98%
	ORF Glycoprotéine	Nom ORF	ORF 3 (frame 3)
		Taille (nt)	2052
		Position	7038-9089
		% Identité (blastx)	98%
	ORF Nucléoprotéine	Nom ORF	ORF 5 (frame 2)
		Taille (nt)	1236
		Position	9383-10618
		% Identité (blastx)	99%

### 3.5.3. Génome du virus “Lihan tick virus-Like”

Six et quatre séquences contigs ont permis l'identification des segments L et S, respectivement, d'un nouveau virus proche du *Phlebovirus* Lihan tick virus (**LTV**). Dans un premier temps, les six contigs du segment L ont été assemblés, puis 19 475 reads ont été alignés sur la séquence consensus contig permettant ainsi de reconstruire la séquence du segment L du nouveau virus, appelé Lihan tick virus-Like (**LTVL**). De même, les quatre contigs du segment S ont été assemblés, puis 7 974 reads ont été alignés sur la séquence consensus contig permettant ainsi de reconstruire la séquence du segment S du **LTVL**.

Le LTVL présente un génome de type ARN segmenté et linéaire, avec un segment L de 6 529 nt et un segment S de 1 769 nt. Le LTV partage 95,1% et 96,7 % d'identité de séquences nucléotidiques avec les segments L et S du LTV respectivement, suggérant la présence d'un variant (ou nouveau génotype) du LTV. Lorsque l'on compare la taille des segments L et S entre le LTVL et le LTV (Tableau 8), les longueurs sont quasi similaires, les segments du LTVL étant légèrement plus longs, ce qui suggère que nous ayons reconstruit la totalité de la séquence de ces deux segments. Le génome du LTVL présente la même organisation génomique que le génome de référence pour chacun des segments, avec des ORF majoritaires structurés de façon similaire et de même taille (Tableau 8) : l'ORF présente sur le segment L code putativement pour l'ARN polymérase ARN-dépendante, et celle présente sur le segment S pour la protéine de nucléocapside (Figure 9).



**Figure 9. Génome du Lihan tick virus-Like (LTVL) détecté en NGS.**

Les séquences ORF ont été analysées à l'aide de l'algorithme blastx (Tableau 8). L'ORF qui correspond à l'ARN polymérase du LTVL partage 99% d'identité de séquences avec l'ARN polymérase du LTV (AJG39242.1). L'ORF correspondant à la protéine de nucléocapside du LTVL partage également 98% d'identité de séquences avec la protéine de nucléocapside du LTV (AJG39308.1). Les pourcentages d'identité de séquences protéiques

très élevés entre les deux protéines du LTVL et du LTV, suggèrent là encore la présence d'un variant du LTV dans nos échantillons de tique.

**Tableau 8 : Comparaisons des génomes et des ORF du virus Lihan tick virus-Like (LTVL), détecté en NGS, et du génome de référence du Lihan tick virus (LTV).**

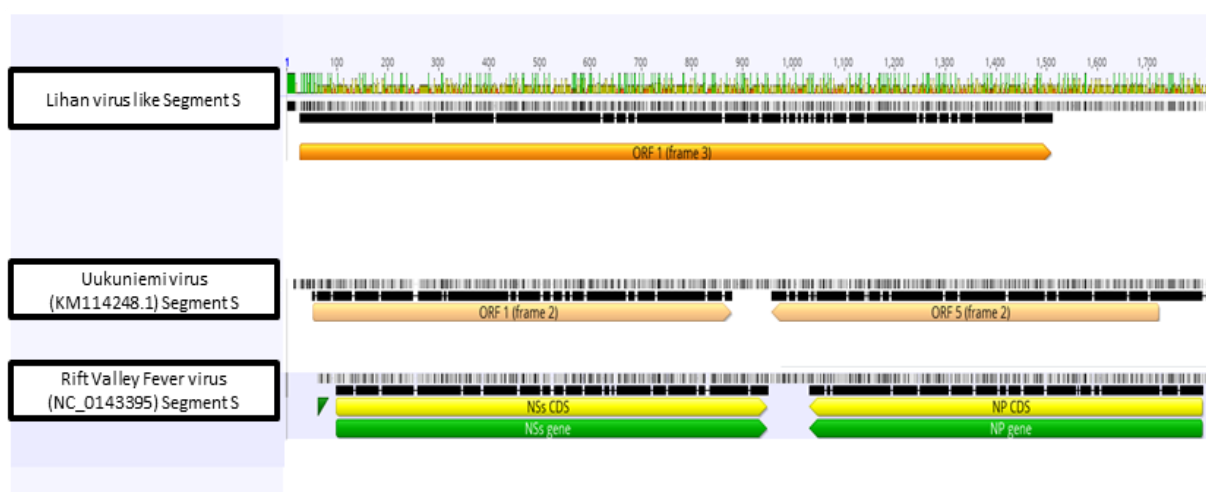
Virus		LTVL		LTV
Génome	Nature	ARN linéaire segmenté		ARN linéaire segmenté
	Affiliation	Phlebovirus		Phlebovirus
	Segment L	Numéro accession	/	KM817672.1
		Taille (nt)	6529	6517
		Nombre de reads	19475	/
		% Identité (Alignement)	95,1%	
	Segment S	Numéro accession	/	KM817736.1)
		Taille (nt)	1769	1762
		Nombre de reads	7974	/
		% Identité (Alignement)	96,7%	
ORF	ORF ARN polymérase	Localisation	Segment L	
		Nom ORF	ORF 1 (frame 2)	AJG39242.1
		Taille (nt)	6456	6456
		Position	44-6499	21-6476
	ORF Nucléocapsides	% Identité (blastx)	99%	
		Localisation	Segment S	
		Nom ORF	ORF 1 (frame 3)	AJG39308.1
		Taille (nt)	1434	1434
		Position	27-1460	29-1462
		% Identité (blastx)	98%	

Le LTV a été classé parmi le genre *Phlebovirus* transmis par les tiques, et plus particulièrement au groupe « Uukuniemi virus » (38,6% d'identité de séquence protéique), suggérant que le LTVL décrit dans cette étude serait également un *Phlebovirus*. Les *Phlebovirus* font partie de la famille des *Bunyaviridae*, qui présente un génome à trois segments, avec le Segment L codant la polymérase, le segment M les glycoprotéines et le

segment S la protéine de nucléocapside. Cependant, à l'instar de l'étude de Li *et al.*, 2015, aucune séquence de notre jeu de données n'a permis d'identifier le segment M, que ce soit en analysant les séquences nucléotidiques par blastn ou les séquences protéiques traduites par blastx. Sachant que nous annotons nos séquences contigs par recherche d'identité de séquence sur les bases de données, on peut penser que soit (1) le LTV et LTVL ont une séquence nucléotidique du segment M tellement polymorphe que la recherche par identité ne permet pas de l'identifier, soit (2) le LTV et LTVL ne sont pas des *Phlebovirus*.

De plus, les séquences des segments L et S du LTV et du LTVL ne comportent pas les séquences clés des *Phlebovirus* normalement présentes en 5'-UTR (ACACAAAG) et 3'-UTR (CUUUGUGU = CTTTGTGT) (Elliott and Brennan, 2014). Là encore, soient les séquences clés ne sont pas présentes, ce qui tend à penser que les LTVL et LTV ne sont pas des *Phlebovirus* mais des virus proches, soient les génomes des segments L et S ne sont pas complets et nous n'avons donc pas les séquences 5' et 3' UTR.

De plus, les *Phlebovirus*, présentent sur le segment S une séquence codante ambisens : la nucléoprotéine est codée dans le sens négatif, et les protéines NSs (facteurs de virulence) sont codées dans le sens positif. Cela signifie, que le segment S est directement transcrit puis traduit en nucléocapsides, et en parallèle le segment S est répliqué, donnant ainsi un anti génome qui est transcrit à son tour puis traduit en protéine NSs. Or la séquence du segment S du LTVL ne montre pas d'ORF de type NSs (Figure 10).



**Figure 10.** Comparaison de la structure génomique du segment S du Lihan Tick Virus-Like, avec celle de deux *Phlebovirus*, le Uukuniemi virus et le Rift Valley Fever Virus.

La présence du facteur de virulence porté par la protéine NSs chez les *Phlebovirus* semble liée à la capacité du virus à devoir s'adapter et se répliquer dans différents hôtes. Ainsi, en absence d'alternance d'hôte, le virus va avoir tendance à perdre ses facteurs de virulence. Cela a été démontré pour le virus de la fièvre de la Vallée du Rift, qui cultivé en continu sur des cellules de moustique présentait une délétion dans la séquence codante de la NSs et une perte de virulence (Moutailler *et al.*, 2011). Ainsi, si le LTVL est un *Phlebovirus*, l'absence d'ORF codant la protéine NSs suggérerait une adaptation de ce virus à son hôte, avec une réplication virale uniquement chez la tique, et donc une absence probable de virulence.

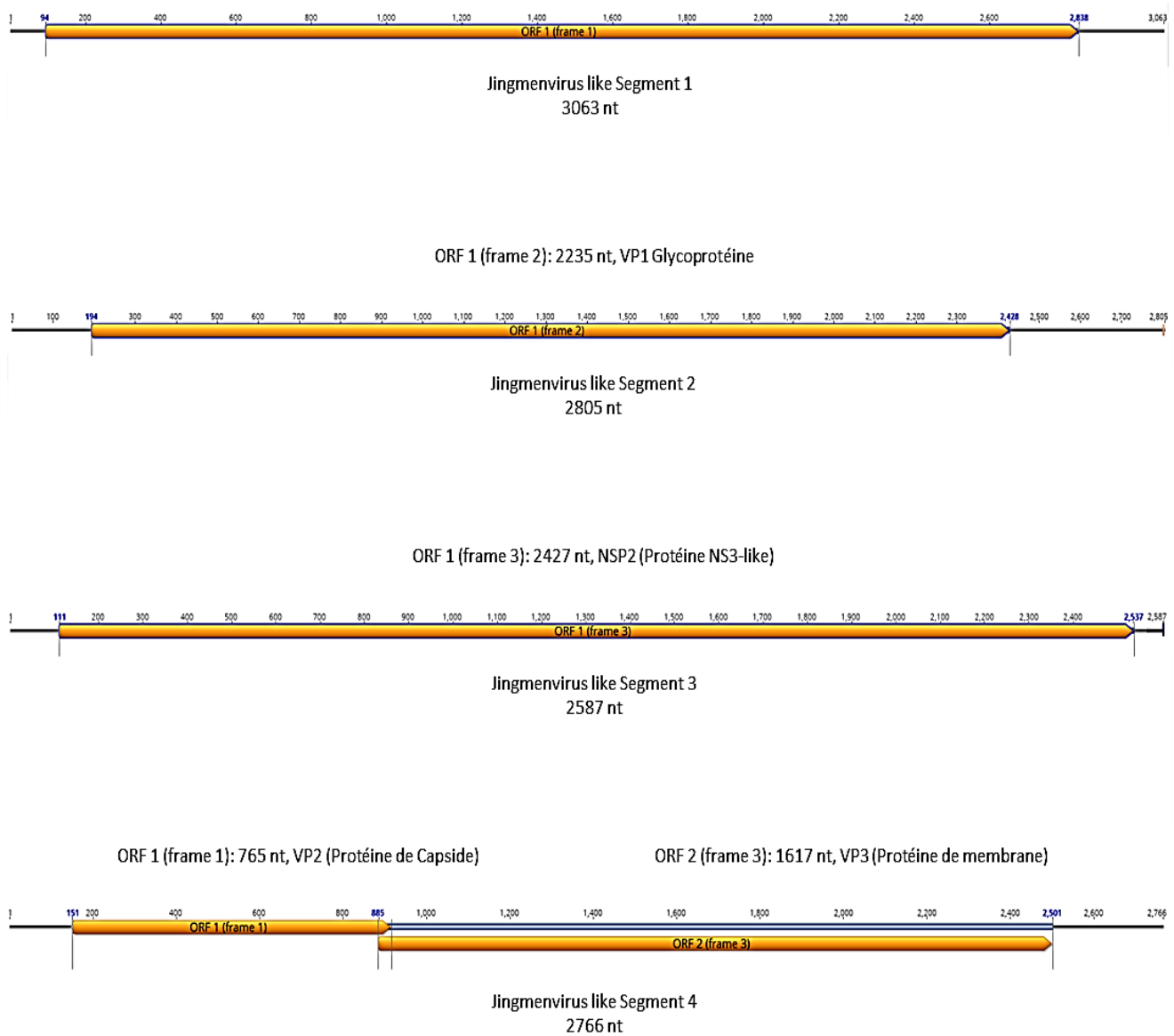
Pour conclure, la classification du LTVL en tant que *Phlebovirus*, reste encore à être prouvée. On peut noter que le LTV avait été retrouvé dans des tiques *Rhipicephalus microplus* en Chine, la même espèce de tique qui est présente dans nos échantillons de Guadeloupe et Martinique (Li *et al.*, 2015).

#### 3.5.4. Génome du virus “Jingmenvirus-Like”

34, 25, 18 et 32 séquences contigs ont permis l'identification des segments 1, 2, 3 et 4, respectivement, d'un nouveau virus proche de deux Jingmenvirus décrit récemment, le Jingmen tick virus (**JTV**) et le Mogiana tick virus (**MTV**). Dans un premier temps les contigs associés à chaque segment ont été assemblés, puis les reads ont été alignés. 356 252, 447 845, 317 310 et 329 766 reads ont été alignés sur chacune des séquences consensus contig permettant ainsi de reconstruire les séquences des segment 1, 2, 3 et 4, respectivement, du nouveau virus, appelé Jingmenvirus-Like (**JVL**) (Figure 11).

Les pourcentages d'identité entre les segments du JVL et ceux du JTV et du MTV sont d'environ 80% (Tableau 9), sachant que le pourcentage d'identité entre les segments du JTV et du MTV est proche de 90%. Ce résultat suggère que le JVL serait d'avantage un nouveau virus plutôt qu'un variant, et ferait partie du nouveau groupe des *Jingmenvirus* incluant le JTV et le MTV. Le JTV et le MTV ont été récemment décrits, chacun dans des tiques *Rhipicephalus microplus* de Chine et du Brésil respectivement (Qin *et al.*, 2014 ; Maruyama *et al.*, 2014 ; Villa *et al.*, 2017). Les *Jingmenvirus* forment un groupe monophylétique de virus à génome segmenté, phylogénétiquement très proches de la famille des virus non segmentés de la famille des *Flaviviridae* (Shi *et al.*, 2015 ; Ladner *et al.*, 2016).

ORF 1 (frame 2): 2745 nt, NSP1 (Protéine NS5-like)  
**Figure 11. Génome du Jingmenvirus-Like (JVL) détecté en NGS.**



Les *Jingmenvirus* bien que très divers, ont une structure génomique relativement bien conservée avec un génome ARN segmenté, majoritairement à 4 segments, avec les trois premiers qui sont monocistroniques alors que le dernier segment est polycistronique (Ladner



*et al.*, 2016). Ainsi le JVL décrit dans cette étude présente un génome ARN segmenté et linéaire, à quatre segments, de 3 063, 2 805, 2 587, et 2 766 nt pour les segments 1, 2, 3 et 4 respectivement. Le JVL présente la même organisation en gènes que les *Jingmenvirus*, pour les segments 1 à 3, un ORF majoritaire a été retrouvé, et deux ORF chevauchants ont été identifiés sur le segment 4 (Figure 11).

Les segments 1 et 3 portent les ORF qui codent les protéines non structurales, très similaires aux protéines retrouvées chez les *Flavivirus*. Le segment 1 porte l'ORF qui coderait pour la protéine non structurale NSP1, incluant l'ARN polymérase ARN dépendante, qui est phylogénétiquement très proche de la protéine NS5 des *Flavivirus*. De la même façon le segment 3 porte l'ORF qui coderait pour la protéine non structurale NSP2, incluant la sérine protéase, et l'ARN hélicase, qui est phylogénétiquement très proche de la protéine à deux composantes NS3 des *Flavivirus*. La NSP1 et la NSP2 du JVL sont assez conservées, elles partagent 92-93% et 93-94% d'identité de séquences avec les protéines des JTV et MTV (Tableau 9).

Enfin les segments 2 et 4 portent les ORF qui coderaient pour les protéines virales de structure des *Jingmenvirus*. Le segment 2 porte l'ORF qui coderait pour la protéine virale de type glycoprotéine, VP1, partageant 89 et 88% d'identité de séquences avec celle du JTV et du MTV (Tableau 9). Le segment 4 présente deux ORF chevauchants, l'un codant pour la protéine de nucléocapside VP2, partageant 85% d'identité de séquences avec les protéines des JTV et MTV et l'autre pour la protéine membranaire VP3, partageant 91 et 89% d'identité de séquences avec les protéines des JTV et MTV (Tableau 9).

Les *Jingmenvirus* ont été décrits chez différents arthropodes (moustique, tique, etc...) et récemment chez un primate (Shi *et al.*, 2015 ; Ladner *et al.*, 2016). On peut noter que le JTV et le MTV ont tous deux été retrouvés dans des tiques *Rhipicephalus microplus*, la même espèce de tique présente dans nos échantillons (Qin *et al.*, 2014 ; Maruyama *et al.*, 2014 ; Villa *et al.*, 2017).

**Tableau 9 : Comparaisons des génomes et des ORF du Lihan tick virus-Like (LTVL), détecté en NGS, et du génome de référence du Lihan tick virus (LTV).**

		JVL	JTV	MTV	
Génome	Nature	ARN linéaire segmenté			
	Affiliation	Jingmenvirus			
	Segment 1	Numéro accession	JVL segment 1	NC_024113.1	JX390986.2
		Taille (nt)	3063	3114	2963
		Nombre de reads	356252	/	/
		% Identité (Alignement)	/	79,7%	80%
	Segment 2	Numéro accession	JVL segment 2	NC_024112.1	NC_034225.1
		Taille (nt)	2805	2847	2629
		Nombre de reads	447845	/	/
		% Identité (Alignement)	/	80,7%	79,4%
	Segment 3	Numéro accession	JVL segment 3	KJ001581.1	JX390985.2
		Taille (nt)	2587	2824	2705
		Nombre de reads	317310	/	/
		% Identité (Alignement)	/	78,6%	78,6%
	Segment 4	Numéro accession	JVL segment 4	NC_024111.1	KY523074.1
		Taille (nt)	2766	2794	2728
		Nombre de reads	329766	/	/
		% Identité (Alignement)	/	78%	78,9%
ORF	ORF Protéine NS5-like	Localisation	Segment 1		
		Nom ORF	ORF 1 (frame 1)	YP_009029999.1	YP_009351917.1
		Taille (nt)	2745	2745	2745
		Position	94-2838	105-2849	92-2836
		% Identité (blastx)	/	93%	92%
	ORF Glycoprotéine	Localisation	Segment 2		
		Nom ORF	ORF 2 (frame 2)	YP_009029998.1	YP_009351920.1
		Taille (nt)	2235	2265	2262
		Position	194-2428	174-2438	51-2312
		% Identité (blastx)	/	89%	88%
	ORF Protéine NS3-like	Localisation	Segment 3		
		Nom ORF	ORF 1 (frame 3)	YP_009030000.1	YP_009351918.1
		Taille (nt)	2427	2427	2427
		Position	111-2537	117-2543	103-2529
		% Identité (blastx)	/	93%	94%
	ORF Nucléocapsides	Localisation	Segment 4		
		Nom ORF	ORF 1 (frame 1)	AOD41701.1	ARA90281.1
		Taille (nt)	765	765	765
Position		151-915	146-910	131-895	
% Identité (blastx)		/	91%	89%	
ORF Protéine membranaire	Localisation	Segment 4			
	Nom ORF	ORF 4 (frame 3)	AOD41700.1	YP_009351919.1	
	Taille (nt)	1617	1617	1506	
	Position	885-2501	880-2496	976-2481	
	% Identité (blastx)	/	85%	85%	

## **4. Discussion**

Nous avons réalisé une analyse du transcriptome total des ARNs issus de tiques de Guadeloupe et de Martinique. Malgré une grande partie de séquences non assignées, cette analyse nous a permis de générer une vue d'ensemble des bactéries, parasites et virus présents et potentiellement transmis par les tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* dans les Antilles Françaises.

Nous avons pu identifier des genres bactériens et parasitaires connus pour être présents ou transmis soit par *Amblyomma variegatum* soit par *Rhipicephalus microplus* dans les Caraïbes, tels que les *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, et *Babesia*. De même, l'analyse des données de séquençage suggère également la présence de bactéries et parasites appartenant à des genres peu décrits dans la zone d'étude tels que les *Borrelia*, *Coxiella* et *Theileria*. Toutefois, notre analyse ne permet pas (ou peu) de discriminer les microorganismes au niveau de l'espèce, notamment concernant les séquences *Theileria*, où aucune espèce en particulier n'a pu être déterminée. Généralement les séquences contigs obtenues étaient courtes, et correspondaient à des portions de transcrit de gènes conservées parmi les genres bactériens précités, notamment ceux des gènes des ARN ribosomiaux. La faible capacité discriminatoire à l'échelle de l'espèce de notre analyse peut être expliquée par la faible qualité de notre échantillon d'ARNs. En effet, l'échantillon d'ARNs est arrivé en partie décongelé sur Paris, et le RIN, qui permet d'évaluer l'intégrité des ARNs, était de 3, suggérant une dégradation de l'échantillon, fournissant des ARN moins nombreux et plus courts qu'espérés. En comparaison, les précédentes études réalisées sur le transcriptome d'*Ixodes ricinus* en Europe, qui avaient utilisé la même démarche, avaient obtenus 174 841 contigs, soit près de sept fois plus de données que nous (Vayssier *et al.*, 2013 ; Bonnet *et al.*, 2014 ; Moutailler *et al.*, 2016). Néanmoins, ces études n'ont pas utilisé le même protocole d'extraction des acides nucléiques que nous, suggérant que l'extraction commune des ADN/ARN employée dans cette analyse pourrait affecter le rendement en ARN extrait. Ainsi le résultat du séquençage a pu être biaisé, en nous fournissant les informations les plus représentées au sein de l'échantillon, telles que les ARNr, et en perdant l'information relative à des transcrits moins exprimés et plus rares mais potentiellement plus discriminant pour une identification au niveau de l'espèce des microorganismes.

Parmi le peu d'espèces bactériennes et parasitaires retrouvées, nous avons pu identifier des agents pathogènes connus pour circuler dans la zone des Caraïbes. Nous avons identifié

*Anaplasma marginale* et *Babesia bigemina*, deux agents pathogènes de bovins endémiques dans les Caraïbes, transmis par *Rhipicephalus microplus* et induisant des anaplasmoses et babesioses chez le bovin (Camus and Montenegro-James, 1994; Camus and Barre, 1995). De même nous avons pu identifier *Rickettsia africae*, connu pour circuler dans la zone, associée aux tiques *Amblyomma variegatum* (Parola *et al.*, 1998; 1999; Robinson *et al.*, 2009; Kelly *et al.*, 2003; 2010a). L'analyse du transcriptome a également permis d'identifier des espèces bactériennes inattendues pour la zone d'étude telles que *Ehrlichia muris*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia philipii*, *Borrelia miyamotoi* ou encore *Borrelia theileri*. Cependant cette présence, inattendue, à la fois, pour notre zone d'étude et pour les espèces de tiques analysées, doit bien sûr être confirmée. Prenant en compte la longueur, la nature des séquences contigs, ainsi que la possibilité d'erreur de séquençage, les résultats ne sont pas suffisamment robustes pour affirmer la présence de ces agents pathogènes dans nos échantillons de tique.

Finalement, les données de séquençage ont permis de mettre en évidence la présence de quatre virus associés aux arthropodes. Ces virus font tous partie de nouveaux groupes viraux associés aux arthropodes et récemment décrits depuis 2014 (Li *et al.*, 2015 ; Qin *et al.*, 2014 ; Maruyama *et al.*, 2014). La majorité des études de métagénomique concernant la caractérisation du microbiome des tiques porte généralement sur l'analyse des communautés bactériennes et l'analyse du virome des arthropodes n'a reçu encore que très peu d'attention. Or les récentes études portant sur le virome de tiques d'Asie, d'Europe et d'Amérique du Nord ont toutes démontré que les tiques sont les réservoirs d'une diversité importantes en virus à ARN, certains pouvant être pathogènes, et d'autre considérés comme commensaux au vecteur (Shi *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2015 ; Moutailler *et al.*, 2016 ; Pettersson 2017). La caractérisation de ces nouveaux virus, outre leur potentiel intérêt sanitaire, offre également de nouvelles perspectives en terme de phylogénie et d'évolution virale, pour lesquelles les arthropodes semblent jouer un rôle essentiel (Li *et al.*, 2015).

Le séquençage réalisé dans cette étude a permis l'identification de deux *Chuvirus*, le Changping tick virus-Like et le Wuhan tick virus-Like. Le caractère circulaire de leur génome nous a permis de reconstruire la totalité de leur génome. Alors que le CTVL semble être un nouveau virus, le WTVL semble être un variant (ou nouveau génotype) du WTV décrit en Chine (Li *et al.*, 2015). Les *Chuvirus*, décrits depuis peu, ont seulement été identifiés au sein d'arthropodes, leur pouvoir infectieux chez les vertébrés reste à élucider. Un *Phlebovirus* du groupe des « Uukuniemi virus » a également été décrit, le Lihan tick virus-Like, un variant (ou nouveau génotype) du virus LTV décrit en Chine (Li *et al.*, 2015). Le « groupe

Uukuniemi » inclut des virus transmis par les tiques, généralement considérés comme non pathogènes. Toutefois, des preuves sérologiques ainsi que trois cas d'infection humaine en Russie suggèrent la capacité de ces virus à se répliquer chez les vertébrés et à être potentiellement pathogènes (Palacios *et al.*, 2013). Les séquences de seulement deux des trois segments du LTVL ont pu être obtenues. Bien que nous ayons identifié la présence des ORF pour chacun des segments L et S, le caractère segmenté de ce génome et le manque de données caractéristiques des *Phlebovirus* telle que l'absence du segment M, ne nous permettent pas d'affirmer l'obtention d'un génome complet. Seul l'isolement de ce virus permettrait de caractériser son génome dans sa totalité et ainsi de pouvoir le classer ou non parmi les *Phlebovirus*. Enfin, un nouveau *Jingmenvirus* a été identifié, le Jingmenvirus-Like. Là encore les quatre segments du virus ont pu être reconstruits, avec la caractérisation de chacune des ORF, suggérant l'obtention d'un génome complet. Les *Jingmenvirus* sont capables d'infecter une large gamme d'hôtes, invertébrés et aussi vertébrés (Ladner *et al.*, 2016).

Trois de ces virus, le WTVL, LTVL et le JVL, ont été précédemment décrits dans des tiques *Rhipicephalus microplus* de Chine et du Brésil (Li *et al.*, 2015 ; Qin *et al.*, 2014 ; Maruyama *et al.*, 2014). Sachant que l'échantillon d'ARNs analysé en séquençage correspond à un mélange d'*Amblyomma variegatum* (158 spécimens) et de *Rhipicephalus microplus* (466 spécimens), il serait intéressant d'étudier s'il existe une spécificité de vecteur, ou si les virus sont retrouvés dans les deux espèces de tique. Il serait également important de déterminer si ces virus sont exogènes, formant des virions à part entière ou s'il existe des formes virales endogènes (EVE), intégrées au génome de l'hôte, ici la tique. Bien que les EVE sont caractérisés par la présence d'ORF interrompues (apparition de codon stop dans la séquence) et que les ORF décrites ici semblent complètes, le risque de présence d'EVE doit être analysé (Katzourakis and Gifford, 2010 ; Holmes, 2011 ; Li *et al.*, 2015). Enfin si ces virus s'avèrent exogènes, l'isolement des souches présentes permettrait d'analyser leurs propriétés phénotypiques. Ces données permettraient d'évaluer d'une part les interactions de ces virus avec leur hôte invertébrés (potentielle influence des virus sur la fitness de la tique, sur la transmission d'agent pathogènes par la tique, etc...) et d'autre part d'évaluer leur potentiel pathogénique (transmission aux vertébrés, facteurs de virulence, etc...) (Hall *et al.*, 2017).

Pour conclure, l'analyse des données de séquençage des tiques collectées en Guadeloupe et en Martinique a permis d'obtenir une vue d'ensemble des genres bactériens, parasitaires et des virus d'intérêt médical et vétérinaire potentiellement présents dans les Antilles Françaises. Cependant l'analyse a révélé un faible pouvoir discriminant au niveau de l'espèce des

microorganismes présents, et enfin les ARNs analysés dans cette étude incluaient un mélange d'ARNs provenant de deux espèces de tiques, *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus*, collectées dans deux îles différentes, nous empêchant d'aller plus loin dans l'interprétation épidémiologique de nos résultats. Il serait notamment important de pouvoir (1) confirmer la présence des agents pathogènes et microorganismes identifiés en NGS (2) tenter l'identification au niveau de l'espèce des genres bactériens et parasitaires détectés dans notre échantillons (3) analyser les échantillons de tique individuelle afin de déterminer des taux d'infections par ces agents pathogènes et microorganismes et d'éventuelles spécificités de vecteur, ou une différence de distribution entre les deux îles. Afin de répondre à ces questions, les deux parties qui vont suivre vont présenter les résultats du criblage des bactéries, parasites et virus présents dans les échantillons de tique individuelle de Guadeloupe et de Martinique à l'aide de la technologie de PCR microfluidiques en temps réel à haut débit.



## Diversité en agents pathogènes transmis par les tiques de Guadeloupe et en Martinique ?

Séquençage sans *a priori* d'un échantillon d'ARN de 597 tiques collectées en Martinique et en Guadeloupe sur bovin (*Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus*)

- Analyse du transcriptome total : identification de séquences de parasites, bactéries et virus associés et potentiellement transmis par les tiques

Force :

- Vue d'ensemble des microorganismes réplicatifs présents dans les tiques
- Détection simultanée des bactéries, parasites et virus

Faiblesse:

- ARN dégradés, contamination en ADN
- Majorité des séquences non assignées
- peu/pas d'identification au niveau de l'espèce

- Détection d'agents pathogènes connus pour circuler et être transmis par les tiques en Guadeloupe et Martinique

*Anaplasma marginale*, *Rickettsia africae*, *Babesia bigemina*

- Détection d'agents pathogènes nouveaux ou inattendus :

- Bactéries du genre *Ehrlichia*, *Coxiella*, *Borrelia*
- Parasite du genre *Theileria*
- Quatre arbovirus

- Perspectives :

Confirmation, Identification des espèces ?

Taux d'infection des tiques individuelles?

➔ Analyse par PCR microfluidiques en temps réel à haut débit.

# **CHAPITRE 2**

**Criblage des agents pathogènes et microorganismes  
dans les tiques des Antilles Françaises  
par PCR microfluidique en temps-réel à haut débit**



## Introduction du Chapitre 2

Les Antilles se situent au cœur de la zone Néotropicale des Caraïbes, et constituent une zone à risque pour l'émergence de maladies vectorielles en raison des conditions climatiques favorables aux vecteurs et des échanges intercontinentaux importants (flux illégal d'animaux, oiseaux migrateurs,...). La situation épidémiologique de la zone Caraïbe vis-à-vis des maladies transmises par les tiques est très peu documentée, notamment au sein de nos départements français d'outre-mer, la Guadeloupe et la Martinique. Les études menées sur le terrain portent essentiellement sur la recherche d'agents pathogènes d'importance vétérinaire, tels que *Ehrlichia ruminantium*, *Babesia* (*bovis* et *bigemina*) et *Anaplasma marginale*, dont la présence affecte considérablement l'économie des industries de l'élevage. La majorité des données épidémiologiques disponibles concernant les agents pathogènes transmis par les tiques repose sur des études de sérologie chez l'animal ou l'homme, ou via la détection d'un nombre restreint de microorganismes par des techniques de biologie moléculaire simple telle que la PCR. Or ces études sont peu discriminantes des diverses espèces infectieuses en présence, et souvent limitées à la recherche de quelques agents pathogènes bien connus, et sont donc loin de pouvoir répondre aux questions concernant le risque d'émergence ou de réémergence de ces maladies.

Les maladies à tique font parties des infections actuellement considérées comme ré-émergentes et dont l'épidémiologie est en pleine évolution. De ce fait l'étude des risques d'apparition et de dispersion des maladies à tiques dépend en grande partie de nos capacités de détection et de diagnostic de ces agents pathogènes. L'utilisation de technologies de détection à haut débit, permettant un dépistage rapide et concomitant d'un large panel d'agents pathogènes au sein d'un grand nombre d'échantillons de tiques, permettrait ainsi d'améliorer nos méthodes de veille sanitaire.

Mon équipe d'accueil à l'ANSES a développé un outil de détection à haut débit des agents pathogènes transmis par les tiques d'Europe. L'outil de détection développé est un support de type puce à ADN, basé sur la technologie BioMark<sup>TM</sup> dynamic arrays (Fluidigm Corporation) qui permet de réaliser de la PCR en temps réel à haut débit sous des volumes de l'ordre du nano-litre afin de détecter 48 à 96 cibles au sein de 48 à 96 échantillons (tique individuelle ou pool) soit 2 304 (ou 9 216) réactions de PCR dans un temps très court. Deux modèles de puce de détection ont ainsi été mis en place, le premier modèle permettant la détection des bactéries et parasites Européens transmis par les tiques, le second modèle quant à lui est dédié au suivi

des arbovirus transmis par les tiques (virus transmis par les arthropodes). Les outils ont été validés dans le cadre de deux projets Européens CoVetLab visant à estimer la prévalence de ces agents pathogènes au sein d'échantillon de tiques provenant de cinq pays Européens, et sont maintenant utilisés en routine dans diverses collaborations (Michelet *et al.*, 2014).

L'un des objectifs de ma thèse était d'adapter cette technologie de détection à haut débit à la recherche d'agents pathogènes transmis par les tiques susceptibles de circuler dans la zone des Caraïbes.

La première partie de ce chapitre présente le développement de la puce de détection des bactéries et parasites pouvant circuler dans les tiques des Caraïbes, et la validation de l'outil sur les tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* collectées en Guadeloupe et en Martinique.

Finalement, la seconde partie de ce chapitre présente l'adaptation de la puce permettant de détecter les arbovirus transmis par les tiques d'intérêt médical et vétérinaire et de répartition mondiale, et son utilisation pour le criblage des virus dans les tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* collectées en Guadeloupe et en Martinique.

# **CHAPITRE 2a**

## **Criblage des bactéries et parasites dans les tiques des Antilles Françaises**

## **Introduction**

Le développement de la puce permettant le suivi des bactéries et parasites transmis par les tiques dans les Caraïbes, ainsi que sa validation sur les échantillons de tiques collectées en Martinique et en Guadeloupe est présenté dans ce manuscrit sous la forme d'un article, devant être soumis prochainement (ci-après).

En préambule de l'article, je souhaitais donner une vision d'ensemble des différentes étapes clés ayant permis le développement de la puce de détection.

La première étape de cette étude consistait à définir la liste des agents pathogènes à détecter. Pour cela, j'ai analysé la littérature scientifique et répertorié l'ensemble des agents pathogènes de types bactéries et parasites d'importance médicale et vétérinaire décrit au moins une fois dans les Caraïbes. Le résultat de cette étude bibliographique a fait l'objet d'une revue, que j'ai placée en chapitre d'introduction de ce manuscrit. En complément de ces informations, j'ai utilisé les données de séquençage issues de la recherche sans *a priori* des agents pathogènes présents dans les tiques de Guadeloupe et de Martinique, décrites en première partie du manuscrit. Au final, j'ai répertorié 74 agents pathogènes d'importance vétérinaire et médicale susceptibles de circuler dans la zone des Caraïbes, incluant 45 et 17 espèces bactériennes et parasitaires respectivement.

Une fois cet inventaire réalisé, j'ai dessiné les sondes et amorces permettant leur détection. Une partie des agents pathogènes listés dans cette étude était en commun avec les agents infectieux ciblés lors du projet Européen, j'ai donc récupéré les designs correspondants dans l'étude de Michelet *et al.*, 2014. Le développement des oligonucléotides utilisés en PCR microfluidique en temps réel suit des règles très strictes, les sondes et amorces devant toutes fonctionner sous les mêmes conditions réactionnelles (les règles de « design » sont disponibles en Annexe 3). Selon les agents pathogènes ou genres bactériens et parasitaires ciblés, le choix des régions spécifiques favorables au développement des sondes et amorces était donc limité. De plus, pour certains agents infectieux plus rares ou décrits récemment, il existait peu de séquences génomiques disponibles dans la base de données du NCBI, diminuant là encore le choix de zones spécifiques. Ainsi, dans la majorité des cas, j'ai dû trouver un compromis entre le respect des contraintes liées au développement des oligonucléotides et leur spécificité. Au final, la puce de détection est constituée de 45 et 17 lots d'amorces et de sondes ciblant des espèces bactériennes et parasitaires, et de 7 et 5 lots d'amorces et de sondes ciblant des genres bactériens et parasitaires. En plus de la recherche

des agents pathogènes, la puce permet également l'identification moléculaire de trois espèces de tiques, les espèces les plus importantes d'un point de vue sanitaire dans les Caraïbes : *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus microplus*, et *Rhipicephalus sanguineus*.

J'ai ensuite testé la sensibilité des sondes et amorces nouvellement développées sur une gamme de dilution d'échantillons témoins positifs (échantillons biologiques et/ou plasmides) en PCR temps réel conventionnelle à l'aide du Light Cycler 480 (Roche diagnostics). Lors du développement de la première puce de détection des agents pathogènes Européens, l'équipe avait constaté la nécessité d'ajouter une étape de pré-amplification de l'ADN des agents pathogènes afin d'augmenter leur signal par rapport à l'ADN de la tique majoritaire lors de l'extraction. J'ai donc testé la qualité du signal de détection de mes amorces et sondes vis-à-vis de leur ADN témoin positif avant et après l'étape de pré-amplification. L'étape de pré-amplification s'est là encore avérée nécessaire.

Enfin, j'ai testé la spécificité de l'ensemble des sondes et amorces constituant la nouvelle puce de détection sur les échantillons témoins positifs en PCR microfluidique en temps réel. Ainsi, j'ai pu juger de la spécificité de chaque oligonucléotide, et inventorier les possibles réactions croisées.

Finalement, j'ai validé la puce de détection sur des échantillons de terrain, en réalisant les criblages des bactéries et parasites présents dans les tiques collectées en Guadeloupe et Martinique, les mêmes échantillons que ceux utilisés pour le séquençage haut débit décrit en première partie de ce manuscrit. Les protocoles de confirmations des résultats obtenus à l'aide de la PCR microfluidique en temps réel sont en cours d'optimisation. Ainsi, malheureusement je n'ai pas encore de résultats de confirmation à présenter dans ce manuscrit.

Pour conclure, je souhaite prévenir le lecteur, l'article qui va suivre qui présente le développement et la validation de l'outil est très détaillé, et ne sera pas soumis dans l'état. Dans le cadre de ce manuscrit de thèse, j'ai souhaité laissé un maximum d'informations au sujet de l'interprétation des résultats. Une fois les confirmations de mes résultats obtenues, lorsque je soumettrais l'article, le texte sera bien sûr grandement réduit.

# Screening of tick-borne pathogens in the French Antilles using new high-throughput microfluidic technology

Mathilde Gondard<sup>1,3</sup>, Sabine Delannoy<sup>2</sup>, Elodie Devillers<sup>1</sup>, Valérie Pinarello<sup>3,4</sup>, Rosalie Aprelon<sup>3,4</sup>, Muriel Vayssier-Taussat<sup>1</sup>, Emmanuel Albina<sup>3,4</sup>, and Sara Moutailler<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, ANSES, INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France.

<sup>2</sup> IdentityPath Platform, Food Safety Laboratory, ANSES, Maisons-Alfort, France

<sup>3</sup> CIRAD, UMR ASTRE, F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France.

<sup>4</sup> ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier, France.

\*Correspondence: Dr. Moutailler Sara, ANSES, [sara.moutailler@anses.fr](mailto:sara.moutailler@anses.fr)

**Keywords:** tick, tick-borne pathogens, molecular epidemiology, surveillance, Caribbean, microfluidic real time PCR technology

## ABSTRACT

The French Antilles, Guadeloupe and Martinique, are located in the heart of the Caribbean Neotropical Zone, an area exposed to a risk for the emergence of vector-borne diseases due to favorable vector conditions and intercontinental exchanges (illegal flow of animals, migratory birds, etc.). The epidemiological situation of the Caribbean area with regard to tick-borne diseases is poorly documented. Very few are known concerning the diversity of tick species and tick-borne pathogens circulating within the Neotropical zone of the Americas, especially concerning the Caribbean area. Most of the epidemiological data on the topic are based on old records and focused on the main livestock pathogens such as *Ehrlichia ruminantium*, *Babesia (bovis and bigemina)* and *Anaplasma marginale*. These observations underline the need to develop high-throughput diagnosis methods that will allow us to conduct large scale epidemiological surveys required to better anticipate the risk of (re)-emergence of tick-borne disease in such areas. In this context, we have adapted from a previous study, a high-throughput real-time PCR system for a large scale screening of tick-borne pathogens potentially circulating in the Caribbean. The technology has been validated with the simultaneous screening of 45 bacterial, and 17 parasitic species (including *Borrelia*,

*Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Francisella*, *Mycoplasma*, *Babesia*, *Theileria*, *Hepatozoon*, *Cytauxzoon*, *Rangelia*, *Leishmania* genus) among 597 ticks collected in Guadeloupe and Martinique. We successfully detected expected (*Rickettsia africae*, *Ehrlichia ruminantium*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale*), and unexpected (such as *Borrelia* spp., *Mycoplasma* spp., *Theileria* spp., *Leishmania* spp. and *Hepatozoon* spp.) pathogens in the French Antilles. This high-throughput detection tool is a major improvement in large scale epidemiological studies, giving a rapid overview of the TBPs diversity present in ticks in a given area.

## Introduction

Among hematophagous arthropods, ticks transmit the greater variety of pathogens of public health and veterinary importance whose (re)-emergence is recognized worldwide (Dantas-Torres *et al.*, 2012). The French Antilles, Guadeloupe and Martinique, are located in the heart of the Caribbean Neotropical Zone, a cosmopolite area characterized by a tropical climate, intercontinental exchanges, and animal movements (legal or illegal trade and bird migration) that are favorable for tick and tick-borne pathogens (TBPs) introduction and dispersal (George *et al.*, 2002).

The epidemiological situation of the Caribbean area with regard to tick-borne diseases is poorly documented. Up to now, few is known concerning the diversity of tick species and tick-borne pathogens circulating in the area (Gondard *et al.*, 2017). *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus microplus* are the two main tropical livestock pests since their introduction in the Caribbean through the importation of infested animals from Africa and Asia during the 18-19<sup>th</sup> century (Barré and Uilenberg, 2010). Both tick species are present in the French Antilles where they are involved in the epidemiology of TBPs of medical and veterinary importance (Morel, 1967; Uilenberg *et al.*, 1983; Camus and Barré 1995; Alonso *et al.*, 1992; Parola *et al.*, 1999). *Rhipicephalus microplus*, a one-host tick highly specific of cattle, is responsible for the transmission of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, causing bovine anaplasmosis and babesiosis, respectively. These pathogens are considered as endemic in the Caribbean (Camus and Montenegro-James 1994; Camus and Barré 1995). *Amblyomma variegatum*, is a three-host tick species, with immature stages that can parasitize a large host range, including rodent, mongoose, bird, and adult stage more specific to cattle (Barré, *et al.*, 1988). This tick species can transmit *Ehrlichia ruminantium*

the causative agent of heartwater, a severe bovine ehrlichiosis. Although *Amblyomma variegatum* is present in both Martinique and Guadeloupe, *Ehrlichia ruminantium* is only reported in Guadeloupe (Vachiéry *et al.*, 2008). This tick species is also vector of *Rickettsia africae*, a human pathogen inducing African Tick Bite Fever (Parola *et al.*, 1999, 2003). Despite high level of tick infection and seroprevalences in human and cattle sera, to date only two human cases from travelers returning from Guadeloupe have been reported (Parola *et al.*, 1999; Raoult *et al.*, 2001). Finally, *Amblyomma variegatum* is also involved in *Theileria mutans* and *Theileria velifera* epidemiology, two cattle parasites inducing low and non-pathogenesis, respectively (Uilenberg 1983; Alonso *et al.*, 1992).

The majority of the epidemiological information available on tick-borne pathogens in the Caribbean are based on serological studies in animals or humans, or molecular biology assays (PCR, nested PCR). Thus, these studies do not survey and discriminate the whole repertoire of the infectious species involved since they are often limited to the detection of some well-known pathogens far from reflecting the actual diversity and circulation of TBPs (Estrada-Peña *et al.*, 2013; Vayssier *et al.*, 2013). Thus, new insights into tick and TBP epidemiology are needed to address TBD emergence in the Caribbean.

The recent development and use of a microfluidic real-time PCR system for rapid and concomitant detection of a large panel of TBPs has opened the way for a promising wider surveillance capacity with the implementation of a large scale epidemiological survey of TBPs in European ticks (Michelet *et al.*, 2014). The technology is based on the use of microfluidic arrays (BioMark™ dynamic array system, Fluidigm) that allows to perform up to 9216 individual real-time PCR reactions in one run, with very few level of DNA required per tick (Michelet *et al.*, 2014).

Here we present the adaptation of this technology to screen a large panel of tick-borne pathogens of medical and veterinary importance that are likely to circulate within the Caribbean. The experiment designed here, allows the detection of 60 TBPs including bacteria and parasites, in 95 DNA tick samples, in a single experiment. We screened those TBPs in 137 *Amblyomma variegatum* and 460 *Rhipicephalus microplus* collected in Guadeloupe and Martinique. We demonstrate the ability of the system to detect well-known TBPs occurring in the French Antilles, as well as unsuspected TBPs and potential new microorganisms. The application of such technology for pathogen detection in large-scale survey within the Caribbean can improve the monitoring of the emerging diseases important to public and animal health in the area.



## 99    **Materials and methods**

### 100    **Tick collected in Guadeloupe and Martinique**

101    A total of 597 adult ticks collected on bovine from Guadeloupe and Martinique were included  
102    in the study. 137 *Amblyomma variegatum* (98 males and 39 females) and 175 *Rhipicephalus*  
103    *microplus* (21 males and 154 females) adult specimens were collected on cattle in  
104    Guadeloupe. Ticks were sampled between February 2014 and January 2015, on 40 bovines  
105    originating from 22 different herds including : four herds from Les Abymes (N 16° 16'; O 61°  
106    31'), three from Sainte-Anne (N 16° 14'; O 61° 23'), Petit Bourg (N 16° 10'; O 61° 36'),  
107    Capesterre (N 16° 2'; O 61° 34'), Le Gosier (N 16° 13'; O 61° 28'), Morne-À-l'Eau (N 16° 19';  
108    O 61° 28'), two from Pointe-Noire (N 16° 13'; O 61° 45'), and one from Bouillante (N 16° 7';  
109    O 61° 46'). 285 *Rhipicephalus microplus* adult specimens were collected on cattle in  
110    Martinique between February and March 2015, from 29 bovines originating from 29 herds:  
111    eight from Le Vauclin (N 14° 32'; O 60° 50'), four from Sainte-Anne (N 14° 26'; O 60° 50'),  
112    Le Robert (N 14° 40'; O 60° 56'), two from Le François (N 14° 36'; O 60° 53'), Saint-Joseph  
113    (N 14° 40'; O 61° 2'), one from Rivière-Pilote (N 14° 28', O 60° 54'), Le Diamant (N 14° 29';  
114    O 61° 1'), Le Lamentin (N 14° 37'; O 60° 59'), Le Lorrain (N 14° 49'; O 61° 2'), Le Morne-  
115    Vert (N 14° 42'; O 61° 8'), Rivière-Salée (N 14° 31'; O 60° 57'), Saint-Esprit (N 14° 33'; O  
116    60° 55'), Sainte-Luce (N 14° 29'; O 60° 56'), and Sainte-Marie (N 14° 46'; O 60° 59').  
117    All the ticks were collected on cattle, partially engorged, and then conserved at -80°C. Ticks  
118    were morphologically identified at the species level (Walker *et al.*, 2003).

### 119    **DNA extraction**

120    For 20 mg of ticks, 1 mL of recently prepared PBS 1X was added to the sample, then ticks  
121    were shaken over 2-3 min at 7 Hz/s with the Tissue Lyzer (Qiagen, Germany) in order to  
122    wash them. After discarding the supernatant, ticks were frozen at -80°C during 15- 20 min.  
123    Then a steel ball was added and samples were crushed twice during 2 min at 30 Hz/s with the  
124    Tissue Lyzer (Qiagen, Germany). 450 µL of fresh PBS 1X were added to the samples.  
125    Samples were vortexed during 10 s, and then centrifuged during 2-3 min at 8000 g. Finally,  
126    20 µL of Proteinase K were added to 180 µL of crushed tick sample and DNA was extracted  
127    using the NucleoSpin® 96 virus Core kit (Macherey-Nagel, Germany) and the automatic  
128    platform Biomek4000. This protocol allows the simultaneous extraction of both DNA and  
129    RNA. Total nucleic acid per sample was eluted in 160 µl of rehydration solution and stored at

130 –80°C until further use. *Amblyomma variegatum* ticks were individually extracted.  
 131 *Rhipicephalus microplus* ticks were extracted both individually and in pool from two to four  
 132 tick specimens.

### 133 Oligonucleotides designs used for the microfluidic system

134 The list of pathogens to be monitored, and the sets of primers and probe required for their  
 135 detection, as well as the targeted genes are shown on Table 1. One part of the oligonucleotides  
 136 used were specifically designed for the purpose of this study, the other part came from  
 137 Michelet *et al.*, 2014. The newly developed oligonucleotides were validated on dilution range  
 138 of positive controls including cultures, plasmids or DNA samples (Table 1) by real-time  
 139 TaqMan PCRs assays on a LightCycler® 480 (LC480) (Roche Applied Science, Germany).  
 140 Real-time PCR assays were performed with LightCycler® 480 Probe Master Mix 1× (Roche  
 141 Applied Science, Germany), using 200 nM of primers and probes in a final volume of 12 µl  
 142 and 2 µl of control DNA were added. The Thermal cycling program was as follows: 95°C for  
 143 5 min, 45 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 15 s and one final cooling cycle at 40°C for 10  
 144 s.

145 **Table 2: List of pathogens, tick species, targets, primers/probe sets, and positive controls. (In grey: Design**  
 146 **from Michelet *et al.*, 2014; In white: Design developed in this study; \*\*: include all the controls belonging**  
 147 **to the genus described in the table and targeted by specific design).**  
 148

Microorganisms	Target	Design Name	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Positive controls
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i>	Rick_spp_gltA_F	GTCGCAAAATGTTACGGTACTT	78	**, Culture of <i>R. slovaca</i>
		Rick_spp_gltA_R	TCTTCGTGCATTCTTTCCATTG		
		Rick_spp_gltA_P	TGCAATAGCAAGAACCGTAGGCTGGATG		
<i>Rickettsia akari</i>	<i>ompB</i>	Ri_aka_ompB_F	GTGCTGTTGCAGGTGGTAC	101	Culture
		Ri_aka_ompB_R	TAAAGTAATACCGTGAATGCAGC		
		Ri_aka_ompB_P	ATTACCAGCACCGTTACCTATATCACCGG		
<i>Rickettsia andeanae</i>	<i>ompB</i>	Ri_and_ompB_F	GGCGGACAGGTAACCTTTTGG	165	Tick naturally infected (tick species unidentified)
		Ri_and_ompB_R	AAGGATCATAGTATCAGGAAGT		
		Ri_and_ompB_P	ACACATAGTTGACGTTGGTACAGACGGTAC		
<i>Rickettsia massiliae</i>	ITS	Ri_ma ITS_F	GTTATTGCATCACTAATGTTATACTG	128	Culture
		Ri_ma ITS_R	GTTAATGTTGTTGCACGACTCAA		
		Ri_ma ITS_P	TAGCCCCGCCACGATATCTAGCAAAAA		
<i>Rickettsia rickettsii</i>	ITS	Ri_ri ITS_F	TCTACTCACAAAGTTATCAGGTAA	124	Plasmid
		Ri_ri ITS_R	CCTACGATACTCAGCAAAATAATTT		
		Ri_ri ITS_P	TCGCTGGATATCGTTGCAGGACTACAG		
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>sca1</i>	Ri_co_sca1_F	GTAGATGCTTCATAGAATACTGC	88	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> naturally infected
		Ri_co_sca1_R	CCAAATTAGTCTACCTTGTGATC		
		Ri_co_sca1_P	TCCTCCTGACGTATTAAGAAGCTGAAGCT		
<i>Candidatus Rickettsia amblyommii</i>	<i>sca1</i>	Ri_amb_sca1_F	GTAATAAATTGGAATCAGTGAC	122	<i>Amblyomma americanum</i> naturally infected
		Ri_amb_sca1_R	TCTTATTTCAGATGGAGTATATGTG		
		Ri_amb_sca1_P	AATTAAACGGACACAAAGAACGACGATACCC		
<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>sca2</i>	Ri_pa_atl_sca2_F	GATAATGAAAAGACAGTAGGACG	85	Two cultures
		Ri_pa_atl_sca2_R	GATCTAAACGCCCTACTGTCT		
		Ri_pa_atl_sca2_P	TTTCATTATCTAAACGCCCTACGGTCTTTTC		

Microorganisms	Target	Design Name	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Positive controls
<i>Rickettsia africae</i>	<i>scal</i>	Ri_af_sca1_F	GATACGACAAGTACCTCGCAG	122	Culture
		Ri_af_sca1_R	GGATTATATACCTTTAGGTTTCGTTAG		
		Ri_af_sca1_P	CAGATAGGAACAGTAATTGTAACGGAACCAG		
<i>Rickettsia felis</i>	<i>orfB</i>	Ri_fel_orfB_F	ACCCTTTTCGTAACGCTTTGTC	163	Culture
		Ri_fel_orfB_R	TATACTTAATGCTGGGCTAAACC		
		Ri_fel_orfB_P	AGGGAAACCTGGACTCCATATTCAAAGAG		
<i>Rickettsia typhi</i>	<i>ompB</i>	Ri_typ_ompB_F	CAGGTCATGGTATTACTGCTCA	133	Two cultures
		Ri_typ_ompB_R	GCAGCAGTAAAGTCTATTGATCC		
		Ri_typ_ompB_P	ACAAGCTGCTACTACAAAAAGTGCTCAAAATG		
<i>Rickettsia prowazekii</i>	<i>gltA</i>	Ri_pro_gltA_F	CAAGTATCGGTAAAGATGTAATCG	151	Plasmid
		Ri_pro_gltA_R	TATCCTCGATACCATAATATGCC		
		Ri_pro_gltA_P	ATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGAT		
<i>Borrelia</i> spp.	23S rRNA	Bo_bu_sl_23S_F	GAGTCTTAAAAGGGCGATTAGT	73	** Culture of <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. valaisiana</i> , <i>B. lusitanae</i> , <i>B. recurrentis</i>
		Bo_bu_sl_23S_R	CTTCAGCCTGGCCATAAATAG		
		Bo_bu_sl_23S_P	TAGATGTGGTAGACCCGAAGCCGAGT		
<i>Borrelia anserina</i>	<i>fla</i>	Bor_ans fla_F	GGAGCACACAAGAGGGAG	76	Plasmid
		Bor_ans fla_R	TTGGAGAAATTAACCCACCTG		
		Bor_ans fla_P	TGCAAGCAACTCCAGCTCCAGTAGCT		
<i>Borrelia lonestari</i>	<i>glpQ</i>	Bor_lon_glpQ_F	GATCCAGAACTTGATACAACCAC	99	<i>Amblyomma americanum</i> naturally infected
		Bor_lon_glpQ_R	TTCATCTAGTGAGAAGTCAGTAG		
		Bor_lon_glpQ_P	AGTAATATCGTCCGTCTCCCTAGCTCG		
<i>Borrelia parkeri</i>	<i>gyrB</i>	Bor_par_gyrB_F	GCAAAACGATTCAAAGTGAGTCC	184	2 cultures
		Bor_par_gyrB_R	CTCATTCGCTTTAAGAAACCACTT		
		Bor_par_gyrB_P	TAAAAACCAGCAACATGAGTTCTCTCTCTC		
<i>Borrelia bissettii</i>	<i>rpoB</i>	Bo_bi_rpoB_F	GCAACCAGTCAGCTTTCACAG	118	Plasmid
		Bo_bi_rpoB_R	CAAATCCTGCCCTATCCCTTG		
		Bo_bi_rpoB_P	AAAGTCCTCCCGGCCAAGAGCATTAA		
<i>Borrelia turicatae</i>	ITS	Bor_tur ITS_F	GACAAATGTTTATTGCATACGGC	101	2 cultures
		Bor_tur ITS_R	TAAACTCAACCCCTCTTAAGCAT		
		Bor_tur ITS_P	AAGTTTGGTTGAAGCATCAGAAAGGCATCTTT		
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>glpA</i>	Bo_bu_glpA_F	GCAATTACAAGGGGTATAAAGC	206	Culture
		Bo_bu_glpA_R	GGCGTGATAAGTGCACATTTCG		
		Bo_bu_glpA_P	TTAATTAACGGGGTGCATTCTTCTCAAGAATG		
<i>Borrelia theileri</i>	<i>glpQ</i>	Bo_th_glpQ_F	GTGCTAACAAAGGACAATATTCC	213	Plasmid
		Bo_th_glpQ_R	GGTTAGTGGAACCGGTTAGGAT		
		Bo_th_glpQ_P	TATTATAATTACGAGCCAGAGCTTGACAC		
<i>Bartonella</i> spp.	<i>ssrA</i>	Bart_spp_ssrA_F	CGTTATCGGGCTAAATGAGTAG	118	**, Culture of <i>B. quintana</i>
		Bart_spp_ssrA_R	ACCCCGCTTAAACCTGCGA		
		Bart_spp_ssrA_P	TTGCAAATGACAACATATGCGGAAGCACGTC		
<i>Bartonella bacilliformis</i>	<i>rpoB</i>	Ba_ba_rpoB_F	GAAGAGTTGTAGTTTGTCTGCA	105	Culture
		Ba_ba_rpoB_R	AGCAGCTACAGAAACCAACTG		
		Ba_ba_rpoB_P	TGCAGGTGAAGTTTGTGTTGCCACG		
<i>Bartonella henselae</i>	<i>ribC</i>	Bar_he_ribC_F	GGGATGCGATTAAATAGTTCTAC	116	Three cultures
		Bar_he_ribC_R	CGCTTGTTGTTTGTATCCTCG		
		Bar_he_ribC_P	ACGTTATAGTAGCGAAAACTTAGAAATTGGTGC		
<i>Bartonella vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	ITS	Bar_vin ITS_F	GGAATTGCTTAACCCACTGTTG	141	Four cultures
		Bar_vin ITS_R	CCTTATTGATTAGATCTGATGGG		
		Bar_vin ITS_P2	AGAAACTCCCGCCTTTATGAGAGAAATCTCT		
<i>Coxiella burnetii</i> and <i>Coxiella</i> -like	<i>Idc</i>	Co_bu_icd_F	AGGCCCGTCCGTTATTTTACG	74	Culture
		Co_bu_icd_R	CGGAAAATCACCATATTCACCTT		
		Co_bu_icd_P	TTCAGGCGTTTTGACCGGGCTTGGC		
	<i>IS1111</i>	Co_bu_IS1111_F	TGGAGGAGCGAACCATTGGT	86	Culture
		Co_bu_IS1111_R	CATACGGTTTGACGTGCTGC		
		Co_bu_IS1111_P	ATCGGACGCTTTATGGGGATGGGTATCC		
<i>Francisella tularensis</i> and <i>Francisella</i> -like	<i>tul4</i>	Fr_tu_tul4_F	ACCCACAAGGAAGTGAAGATTA	76	Culture
		Fr_tu_tul4_R	GTAATTGGGAAGCTTGTATCATG		
		Fr_tu_tul4_P	AATGGCAGGCTCCAGAAGGTTCTAAGT		

Microorganisms	Target	Design Name	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Positive controls
<b>endosymbionts</b>	<i>fopA</i>	Fr_tu_fopA_F	GGCAAATCTAGCAGGTCAAGC	91	Culture
		Fr_tu_fopA_R	CAACACTTGCTTGAACATTTCTAG		
		Fr_tu_fopA_P	AACAGGTGCTTGGGATGTGGGTGGTG		
<b>Anaplasma spp.</b>	16S rRNA	Ana_spp_16S_F	CTTAGGGTTGTAAACTCTTTTCAG	160	**
		Ana_spp_16S_R	CTTTAACTTACCAAACCGCCTAC		
		Ana_spp_16S_P	ATGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGAACA		
<b>Anaplasma marginale</b>	<i>msp1b</i>	An_ma_msp1_F	CAGGCTTCAAGCGTACAGTG	85	cow blood experimentally infected
		An_ma_msp1_R	GATATCTGTGCCTGGCCTTC		
		An_ma_msp1_P	ATGAAAGCCTGGAGATGTTAGACCGAG		
<b>Anaplasma phagocytophilum</b>	<i>msp2</i>	An_ph_msp2_F	GCTATGGAAGGCAGTGTTGG	77	Two blood samples of infected animal, on sample of <i>Ixodes</i> spp. tick naturally infected
		An_ph_msp2_R	GTCTTGAAGCGCTCGTAACC		
		An_ph_msp2_P	AATCTCAAGCTCAACCTGGCACCAC		
<b>Anaplasma platys</b>	<i>groEL</i>	An_pla_groEL_F	TTCTGCCGATCCTTGAAAACG	75	Blood of infected dog
		An_pla_groEL_R	CTTCTCCTTCTACATCCTCAG		
		An_pla_groEL_P	TTGCTAGATCCGGCAGGCCTCTGC		
<b>Anaplasma bovis</b>	<i>groEL</i>	An_bo_groEL_F	GGGAGATAGTACACATCCTTG	73	Plasmid
		An_bo_groEL_R	CTGATAGCTACAGTTAAGCCC		
		An_bo_groEL_P	AGGTGCTGTTGGATGTACTGCTGGACC		
<b>Anaplasma ovis</b>	<i>msp4</i>	An_ov_msp4_F	TCATTCGACATGCGTGAGTCA	92	Plasmid
		An_ov_msp4_r	TTTGCTGGCGCACTCACATC		
		An_ov_msp4_P	AGCAGAGAGACCTCGTATGTTAGAGGC		
<b>Ehrlichia spp.</b>	16S rRNA	Neo_mik_16S_F	GCAACGCGAAAAACCTTACCA	98	**
		Neo_mik_16S_R	AGCCATGCAGCACCTGTGT		
		Neo_mik_16S_P	AAGGTCCAGCCAAACTGACTCTTCCG		
<b>Ehrlichia canis</b>	<i>gltA</i>	Eh_ca_gltA_F	GACCAAGCAGTTGATAAAGATGG	136	Culture
		Eh_ca_gltA_R	CACATAAGACAATCCATGATTAGG		
		Eh_ca_gltA_P	ATTAAAACATCCTAAGATAGCAGTGGCTAAGG		
<b>Ehrlichia chaffeensis</b>	<i>dsb</i>	Eh_ch_dsb_F	TATTGCTAATTACCCCAAAAAAGTC	117	<i>Amblyomma americanum</i> naturally infected
		Eh_ch_dsb_R	GAGCTATCCTCAAGTTCAGATT		
		Eh_ch_dsb_P	ATTGACCTCCTAACTAGAGGGCAAGCA		
<b>Ehrlichia ewingii</b>	<i>dsb</i>	Eh_ew_dsb_F	CAATACTTGGAGAAGCATCATTG	111	<i>Amblyomma americanum</i> naturally infected
		Eh_ew_dsb_R	TTGCTTATGGCTTAATGCTGCAT		
		Eh_ew_dsb_P	AAAGCAGTACGTGCAGCATTGGCTGTA		
<b>Ehrlichia ruminantium</b>	<i>gltA</i>	Eh_ru_gltA_F	CCAGAAAACCTGATGGTGAGTTAG	116	Culture
		Eh_ru_gltA_R	AGCCTACATCAGCTTGAATGAAG		
		Eh_ru_gltA_P	AGTGTAAACTTGCTGTTGCTAAGGTAGCATG		
<b>Panola Mountain Ehrlichia</b>	<i>gltA</i>	Eh_PME_gltA_F	GCTAGTTATGAGTTAGAATGTAAAC	121	<i>Amblyomma americanum</i> naturally infected
		Eh_PME_gltA_R	TACTATAGGATAATCTTGAATCAGC		
		Eh_PME_gltA_P	TTGCTATCGCTAAAATCCAAGTATGATTGCG		
<b>Neoehrlichia mikurensis</b>	<i>groEL</i>	Neo_mik_groEL_F	AGAGACATCATTCGCATTTTGGGA	96	Two tick samples naturally infected , one blood sample of infected rodent
		Neo_mik_groEL_R	TTCCGGTGTACCATAAGGCTT		
		Neo_mik_groEL_P	AGATGCTGTTGGATGTACTGCTGGACC		
<b>Aegyptianella pullorum</b>	<i>groEL</i>	Ae_pul_groEL_F	AGCCAGTATTATCGCTCAAGG	168	Plasmid
		Ae_pul_groEL_R	GCCTCACGTGCGCTTCATAAC		
		Ae_pul_groEL_P	TGCTTCTCAGTGTAACGACAGGGTTGG		
<b>Wolbachia</b>	<i>wsp</i>	Wolb_spp_wsp_F	AGGACTAGTTGACGTTTATTACG	80	Plasmid
		Wolb_spp_wsp_R	CTGCACCAACACCAACACC		
		Wolb_spp_wsp_P	ATGTAGCGATTGAAGATATGCCTGTCACTCC		
<b>Mycoplasma spp.</b>	16S rRNA	Myc_spp_16S_F	GTGACGGCTAACTATGTGCC	77	Plasmid
		Myc_spp_16S_R	GCTTTACGCCCAATAATTCCG		
		Myc_spp_16S_P	AGCAGCTGCGGTAATACATAGGTCGC		
<b>Mycoplasma ovis</b>	<i>rnpB</i>	Myc_ov_rnpB_F	GACTCAACGACTAGTTCTACTAG	106	Plasmid
		Myc_ov_rnpB_R	CTATAAAGCTCGTCTCTGTGG		
		Myc_ov_rnpB_P	TTGATGGCGGAGAACTTTTCTAAATAAGCC		
<b>Mycoplasma haemocanis</b>	23S rRNA	Myc_hca_23S_F	AGCGGGTTATTGGATTCTCGT	126	Plasmid
		Myc_hca_23S_R	AGAATATGATGTTTGCAGCTTCG		
		Myc_hca_23S_P	TTAAGCTGCAAGTGTTTCGGGTAGTAAAATAC		

Microorganisms	Target	Design Name	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Positive controls
<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i>	16S rRNA	Myc_hpa_16S_F	CGAAGAGGGCTTGCCCTC	85	Plasmid
		Myc_hpa_16S_R	CCTTTCGGATTGCTATICTCC		
		Myc_hpa_16S_P	TTAGTGGCGAACGGGCGAGTAACGC		
<i>Mycoplasma suis</i>	rnpB	Myc_su_rnpB_F	ACTTAACGGCTAGAGAAATCTAG	131	Plasmid
		Myc_su_rnpB_R	TTTACCGCGTTTCACACTTTTAC		
		Myc_su_rnpB_P	ATTTCTGTAAAGCTCGTCTCTGTGGCACT		
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	dnaK	Myc_hfe_dnaK_F	TTGGCTACTTCTGGTGATAACC	90	Plasmid
		Myc_hfe_dnaK_R	GTGTTCCCTTCTTGATTCTCTCTA		
		Myc_hfe_dnaK_P	ATTTGGGTGGTGACGATTGGGATCAAGC		
<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>	16S rRNA	Myc_hmi_16S_F	CTCGCGAGCAGAGAGGAG	123	Plasmid
		Myc_hmi_16S_R	ATATGGGCGGTATTTCAATCCC		
		Myc_hmi_16S_P	ATTGCGGCTGGTCGACCCCTCAGT		
<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>	rnpB	Myc_htu_rnpB_F	GACGGCTGTAGTGATGATGC	100	Plasmid
		Myc_htu_rnpB_R	GATTCTGAAATAGTAACCTCTCGTC		
		Myc_htu_rnpB_P	TTAGTTTCAGAATCGCCATCACCTTTTGGG		
<i>Mycoplasma wenyonii</i>	23S rRNA	Myc_we_23S_F	CACAAGAGTGAGAATCGAATACG	89	Plasmid
		Myc_we_23S_R	TATTCCTAGAGTCTTTTCTGGAG		
		Myc_we_23S_P	AACGTGATTAAGTCTGGCTCTCTCAGC		
<i>Apicomplexa</i>	18S rRNA	Apic_18S_F	TGAACGAGGAATGCCTAGTATG	104	** Culture of <i>B. divergens</i> ; Blood of Infected dog, with <i>B. canis rossii</i> , <i>B. canis canis</i> ; Culture of <i>T. lestoquari</i> , <i>T. annulata</i>
		Apic_18S_R	CACCGGATCACTCGATCGG		
		Apic_18S_S	TAGGAGCGACGGGCGGTGTGTAC		
<i>Babesia ovis</i>	18S rRNA	Ba_ov_18S_F	TCTGTGATGCCCTTAGATGTC	92	Plasmid
		Ba_ov_18S_R	GCTGGTTACCCGCGCCTT		
		Ba_ov_18S_P	TCGGAGCGGGGTCAACTCGATGCAT		
<i>Babesia bigemina</i>	18S rRNA	Ba_big_RNA18S_F	ATTCCGTAAACGAACGAGACC	99	Plasmid
		Ba_big_RNA18S_R	TTCCCCACGCTTGAAGCA		
		Ba_big_RNA18S_P	CAGGAGTCCCTCTAAGAAGCAAACGAG		
<i>Babesia gibsoni</i>	Rap1	Ba_gib_rap1_F	CTCTTGCTCATCATCTTTTCGG	130	Plasmid
		Ba_gib_rap1_R	TCAGCGTATCCATCCATTATATG		
		Ba_gib_rap1_S	TTAATGCGTGCTACGTTGTACTTCCCAAAG		
<i>Babesia caballi</i>	Rap1	Ba_cab_rap1_F	GTTGTTTCGGCTGGGGCATC	94	Plasmid
		Ba_cab_rap1_R	CAGGCGACTGACGCTGTGT		
		Ba_cab_rap1_P	TCTGTCCCAGTGTC AAGGGGCAGGT		
<i>Babesia bovis</i>	CCTeta	Ba_bo_CCTeta_F	GCCAAGTAGTGGTAGACTGTA	100	Plasmid
		Ba_bo_CCTeta_R	GTCCCGTCAATTGGTTATGGTA		
		Ba_bo_CCTeta_P	TAAAGACAACACTGGGTCCGCGTGG		
<i>Babesia canis vogeli</i>	hsp70	Ba_vo_hsp70_F	TCACTGTGCCTGCGTACTTC	87	Blood of infected dog
		Ba_vo_hsp70_R	TGATACGCATGACGTTGAGAC		
		Ba_vo_hsp70_P	AACGACTCCCAGCGCCAGGCCAC		
<i>Babesia duncani</i>	ITS2	Ba_du_ITS_F	ATTTCCGTTTGCGAGAGTTGC	87	Plasmid
		Ba_du_ITS_R	AGGAAGCATCAAGTCATAACAAC		
		Ba_du_ITS_P	AACAAGAGGCCCCGAGATCAAGGCAA		
<i>Babesia microti</i>	CCTeta	Bab_mi_CCTeta_F	ACAATGGATTTTCCCCAGCAAAA	145	Culture
		Bab_mi_CCTeta_R	GCGACATTTCCGCAACTTATATA		
		Bab_mi_CCTeta_P	TACTCTGGTGCAATGAGCGTATGGGTA		
<i>Theileria spp.</i>	18S rRNA	Thei_spp_18S_F	GTCAGTITTTACGACTCCTTCAG		**, Culture of <i>T. lestoquari</i> , <i>T. annulata</i>
		Thei_spp_18S_R	CCAAAGAATCAAGAAAGAGCTATC		
		Thei_spp_18S_S	AATCTGTCAATCCTTCCTTTGTCTGGACC		
<i>Theileria mutans</i>	ITS	The_mu_ITS_F	CCTTATTAGGGGCTACCGTG	119	Plasmid
		The_mu_ITS_R	GTTTCAAATTTGAAGTAACCAAGTG		
		The_mu_ITS_P	ATCCGTGAAAAACGTGCCAACTGGTTAC		
<i>Theileria velifera</i>	18S rRNA	The_ve_18S_F	TGTGGCTTATCTGGGTTCGC	151	Plasmid
		The_ve_18S_R	CCATTACTTTGGTACCTAAAACC		
		The_ve_18S_P	TTGCGTTCCCGGTGTTTTACTTTGAGAAAG		
<i>Theileria equi</i>	ema1	Th_eq_ema1_F4	CGGCAAGAAGCACACCTTC	167	Plasmid
		Th_eq_ema1_R4	TGCCATCGCCCTTGATAGAG		
		Th_eq_ema1_P4	AAGGCTCCAGGCAAGCGCGTCCT		

Microorganisms	Target	Design Name	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Positive controls
<i>Theileria parva</i>	18S rRNA	Th_pa_18S_F	GAGTATCAATTGGAGGGCAAG	173	Two cultures
		Th_pa_18S_R	CAGACAAAGCGAACTCCGTC		
		Th_pa_18S_P	AAATAAGCCACATGCAGAGACCCCGAA		
<i>Cytauxzoon felis</i>	ITS2	Cy_fel_ITS2_F	AAGATCCGAACGGAGTGAGG	119	Plasmid
		Cy_fel_ITS2_R	GTAGTCTCACCAATTTCAGG		
		Cy_fel_ITS2_S	AAGTGTGGGATGTACCGACGTGTGAG		
<i>Hepatozoon spp.</i>	18S rRNA	Hepa_spp_18S_F	ATTGGCTTACCGTGGCAGTG	175	**
		Hepa_spp_18S_R	AAAGCATTTTAACTGCCTTGTATTG		
		Hepa_spp_18S_S	ACGGTTAACGGGGGATTAGGGTTCGAT		
<i>Hepatozoon canis</i>	18S rRNA	He_can_18S_F	TTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAG	221	Blood of infected dog
		He_can_18S_R	AGCAGACCGGTTACTTTTAGC		
		He_can_18S_S	AGAACTTCAACTACGAGCTTTTAACTGCAAC		
<i>Hepatozoon americanum</i>	18S rRNA	He_ame_18S_F2	GGTATCATTTTGGTGTGTTTTAAC	159	Plasmid
		He_ame_18S_R2	CTTATTATTCCATGCTCCAGTATTC		
		He_ame_18S_P2	AAAAGCGTAAAAGCCTGCTAAAAACACTCTAC		
<i>Leishmania spp.</i>	hsp70	Leish_spp_hsp70_F	CGACCTGTTCGACAGCAC	78	**, Plasmid, Culture of <i>L. martiniquensis</i>
		Leish_spp_hsp70_R	TCGTGCACGGAGCGCTTG		
		Leish_spp_hsp70_S	TCCATCTTCGCGTCTGCAGCACG		
<i>Leishmania infantum</i>	ITS	Le_inf_ITS_F	CGCACCCTATACAAAAGC	103	Culture
		Le_inf_ITS_R	GTTATGTGAGCCGTTATCCAC		
		Le_inf_ITS_S	ACACGCACCCACCCGCCAAAAAC		
<i>Rangelia vitalii</i>	18S rRNA	Ra_vit_18S_F	TAACCGTGCTAATTGTAGGGC	92	Plasmid
		Ra_vit_18S_R	GAATCACCAAACCAATGGAGG		
		Ra_vit_18S_S	TAATACACGTCGAGGGCGCGTTTGC		
<i>Tick spp.</i>	16S rRNA	Tick_spp_16S_F	AAATACTCTAGGGATAACAGCGT	99	**
		Tick_spp_16S_R	TCTTCATCAAAACAAGTATCCTAATC		
		Tick_spp_16S_P	CAACATCGAGGTCGCAAACCATTTGTCTA		
<i>Amblyomma variegatum</i>	ITS2	Amb_var_ITS2_F	GCCAGCCTCTGAAGTGACG	117	Wild tick from Guadeloupe
		Amb_var_ITS2_R	TTCTGCGGTTTAAGCGACGC		
		Amb_var_ITS2_P	TCTTGCCACTCGACCGTGCCTC		
<i>Rhipicephalus microplus</i>	ITS2	Rhi_mic_ITS2_F	GCTTAAGCGCTTCTCGTCG	144	Wild tick from Galapagos
		Rhi_mic_ITS2_R	CAAGGGCAGCCACGCAG		
		Rhi_mic_ITS2_P	TAGTCCGCCGTCGGTCTAAGTGCTTC		
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	ITS2	Rhi_san_ITS2_F	TTGAACGCTACGGCAAAGCG	110	Wild tick from France
		Rhi_san_ITS2_R	CCATCACCTCGGTGCAGTC		
		Rhi_san_ITS2_P	ACAAGGGCCGCTCGAAAGGCGAGA		

149

150

## 151 Pre-amplification of DNA samples

152 The Perfecta® PreAmp SuperMix (Quanta Biosciences, Beverly, USA) was used for DNA  
153 pre-amplification, following the manufacturer's instructions. All the primers were pooled  
154 (except the ones targeting the tick species) with a final and equal concentration of 45 nM  
155 each. Pre-amplification reaction was performed in a final volume of 5 µL containing 1 µL of  
156 Perfecta PreAmp SuperMix (5X), 1.25 µL of pooled primers mix, 1.25 µL of DNA and 1.5  
157 µL of MilliQ water with one cycle at 95°C for 2 min, 14 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for  
158 3 min. At the end of the cycling program the reactions were diluted 1:10. Pre-amplified DNAs  
159 were stored at –20°C until use.

## **High-throughput microfluidic real-time PCR**

High-throughput microfluidic real-time PCR amplifications were performed using the BioMark™ real-time PCR system (Fluidigm, USA) and 96.96 dynamic arrays (Fluidigm, USA), that allows to perform 9,216 individual reactions in one run (Michelet *et al.*, 2014). TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA) were used for the amplifications, following the manufacturer's instructions, using 6-carboxyfluorescein (FAM) and black hole quencher (BHQ1)-labeled TaqMan probes. Sample mix of 6 µL was prepared per sample, composed by 3 µL TaqMan® Gene expression Master Mix (Applied Biosystems, USA), 0.3 µL sample Loading Reagent (Fluidigm, USA) and 2.7 µL of diluted pre-amplified DNA. As well, for each target, a TaqMan® oligonucleotide stock assay was prepared containing 18 µM of each primer and 4 µM of probe. 3 µL of stock assays were mixed with 3 µL of Dynamic Array (DA) assay loading reagent (Fluidigm, USA) to make assay mixes (9 µM primers and 2 µM probe). After priming of the chip in the IFC Controller HX apparatus, 5 µL of samples mixes were loaded into the sample inlets and 5 µL of assay mixes were loaded into the assay inlets of the dynamic array chip. Then, the chip was placed on the IFC Controller HX for loading and mixing, during approximatively 90 min. Finally, the loaded chip was placed on the Biomark apparatus for real-time PCR amplifications, with the following program: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 2-step amplification of 15 s at 95°C, and 1 min at 60°C. The BioMark™ Real-Time PCR system was used for data acquisition and the Fluidigm Real-time PCR Analysis software for crossing point (CP) values determination. Three kinds of control were used per chip for experiment validation: a negative water control, to exclude contaminations; a DNA extraction control, corresponding to primers and probe targeting a portion of the 16S rRNA gene of ticks; and an internal control made of a DNA of *Escherichia coli* strain EDL933 added to each sample with specific primers and probe targeting the *eae* gene (Nielsen and Andersen, 2003), to check the presence of PCR inhibitors.

## **PCR/Nested PCR and sequencing for results confirmation**

Conventional PCR/Nested PCR using primers targeting different genes or regions than those of the BioMark™ system (**Table 2**) were used to confirm the presence of pathogenic DNA in the field samples and in some positive controls. Amplicons were sequenced by Eurofins MWG Operon (BIOMNIS-EUROFINS GENOMICS, France), and then assembled using BioEdit software (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). An online BLAST (National Center

for Biotechnology information) was used to compare results with published sequences listed in GenBank sequence databases.

## Infection Rates of ticks from the French Antilles

According to the tick species and the island of origin, for each detected pathogen, infection rates were estimated, consisting in the proportion of infected ticks on the total number of ticks analyzed. The majority of the samples were single specimens of ticks. However, among the 538 samples analyzed, 49 samples consisted in a pool of 2 to 4 tick specimens. Thus, the final estimation of the infection rate was expressed as the minimal and maximal proportions of infected ticks out of the total number of ticks analyzed.

201

**Table 3: Primers used to confirm the presence of pathogenic DNA in tick samples, and positive controls.**

Pathogen	Targeted gene	Primer name	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)	References
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i>	Rsfg877	GGGGGCCTGCTCACGGCGG	381	Regnery <i>et al.</i> , 1991
		Rsfg1258	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA		
<i>Anaplasma/ Ehrlichia</i> spp.	16S rRNA	EHR16SD	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	345	Hornok <i>et al.</i> , 2008
		EHR16SR	TAGCACTCATCGTTTACAGC		
<i>Borrelia</i> spp.	IGS	Bospp-IGS-F1	GTATGTTTAGTGAGGGGGTG	1007	Bunikis <i>et al.</i> , 2004
		Bospp-IGS-R1	GGATCATAGCTCAGGTGGTTAG	388-685	
		Bospp-IGS-F2	AGGGGGGTGAAGTCGTAACAAG		
		Bospp-IGS-R2	GTCTGATAAACCTGAGGTCGGA		
<i>Borrelia</i> spp.	p66	Bospp-p66-F1	GATTTTCTATATTGGACACAT	1007	Bunikis <i>et al.</i> , 2004
		Bospp-p66-R1	AATTTAATCAGATTGTTAGCTCTA	388-685	
		Bospp-p66-F2	GACACATATCTAAAAAGCAAACAC		
		Bospp-p66-R2	CTAATCCGGTTTTTACGTATATGC		
<i>Babesia/ Theileria</i> spp.	18S rRNA	BABGF2	GYTTGTGAATTGGAATGATGG	559	Bonnet <i>et al.</i> , 2007
		BABGR2	CCAAAGACTTTGATTTCTCTC		
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	pCS20	pCS20Sol1F	ACAAATCTGGYCCAGATCAC	110	Cangi <i>et al.</i> , 2017 ( <i>In press</i> )
		pCS20Sol1R	CAGCTTCTGTTCAGCTAGT		
		Sol1 <sup>TM</sup>	ATCAATTCACATGAAACATTACATGCAACTGG		
<i>Babesia bigemina</i>	cytB	cbisg-1	TGTTCCAGGAGATGTTGATTC	88	Buling <i>et al.</i> , 2007
		cbisg-2	AGCATGGAATAACGAAGTGC		
<i>Babesia bovis</i>		cbosg-1	TGTTCTCGGAAGCGTTGATTC		
		cbosg-2	AGCGTGAAAATAACGCATTGC		

203



## Results

### Development of the high-throughput microfluidic real-time PCR system for Caribbean tick-borne pathogens survey

Here, we developed different sets of primers and probes for the detection of 43 bacterial species, 7 bacterial genera, 17 parasitic species, 3 parasitic genera, 1 parasitic phylum. As well, we developed sets of primers and probes allowing the molecular identification of the 3 main tick species involved in TBDs in the Caribbean (Table 1). Each set of primer and probes, except those targeting *Borrelia burgdorferi*, *Candidatus Rickettsia amblyommii* and *Borrelia turicatae*, were able to amplify their corresponding positive control samples (Cp values between 6 to 38) when tested by Taqman real-time PCRs on a LightCycler 480 apparatus. Detection signals were checked before and after DNA pre-amplification, leading to the conclusion that pre-amplification improved the quality of the amplifications (supplementary data 1). Nevertheless, the three designs targeting *Borrelia burgdorferi*, *Candidatus Rickettsia amblyommii* and *Borrelia turicatae*, did not succeed in detecting the positive controls even after a preamplification step and therefore were removed. All other designs were checked for specificity using the Biomark system (Figure 1). The specificity of each primer and probe sets was evaluated using 89 positive controls.

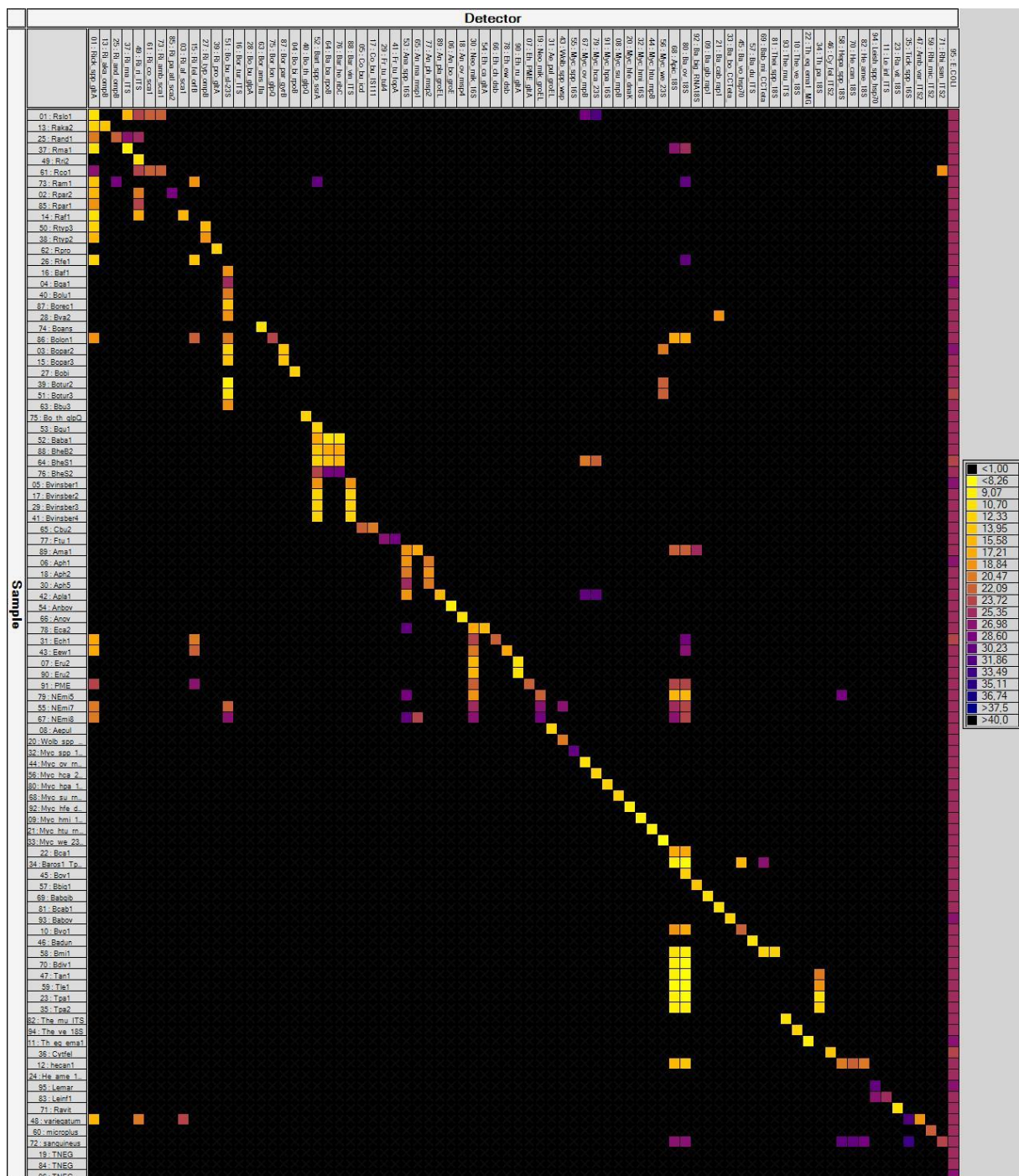


Figure 1. BioMark™ dynamic array system specificity test (96.96 chip). Each square corresponds to a single real-time PCR reaction, where rows indicate the pathogen in the sample and columns represent the target of the primers/probe set. CP values for each reaction are represented by a color gradient; the color scale is shown on the right y-axis. The darkest shades of blue and black squares are considered as negative reactions with CP > 30.

### ***Designs targeting bacterial and parasitic genera and phylum***

Designs targeting the bacterial and parasitic genera are essential for the purpose of a large epidemiological study of TBPs, allowing the detection of potentially new or unsuspected TBPs that would not be directly targeted by the species specific design. The specificity test of the genus detection gave unexpected results (Figure 1). They were able to amplify their positive controls corresponding to bacterial or parasitic species belonging to the targeted genus, except those that are plasmidic samples (absence of the targeted sequence), but most of them gave positive results in outgroup controls. The observed cross-reactions involved positive controls corresponding to DNA from tick samples naturally infected. Thus the challenge was to differentiate real cross-reactions, or non-specific signal, from potential co-infections in those samples. Indeed, as co-infections occur frequently in natural tick, these unexpected detections could be due to natural co-occurrence of microorganisms rather than cross-reactions (Moutailler *et al.*, 2016). As few volumes of positive controls DNA were available, we were not able to test all of them by conventional PCR. To avoid this problem, we tried to sequence the real-time PCR products obtained with the design tested here.

All the *Rickettsia* species tested were detected when using the design targeting the *Rickettsia* genus: *Rickettsia conorii*, *Rickettsia slovaca*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia andenae*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia akari*. However, *Rickettsia* spp. design gave also positive results when testing *Borrelia lonestari*, *Panola Mountain Ehrlichia*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Neoehrlichia mikurensis* (two samples) and *Amblyomma variegatum* samples. These 7 samples are tick DNA naturally infected, or tick collected in the field without previous TBP detection. We first tried to sequence the real-time PCR products obtained with the design developed for the Biomark tool. However, the amplicon length was too small, only 78 pb, to obtain interpretable sequence without prior cloning. Finally we tested the *Panola Mountain Ehrlichia* sample by conventional PCR targeting the *gltA* gene of *Rickettsia* species (Table 2). We obtained a 384 bp sequence, sharing 99% of sequence identity with *Rickettsia* spp. (Table 3). The *Panola Mountain Ehrlichia* control, as well as the *Borrelia lonestari*, *Ehrlichia ewingii* and *Ehrlichia chaffeensis* controls, corresponded to DNA of infected *Amblyomma americanum*. Previous studies demonstrated the presence of co-infections of pathogens and endosymbionts in this tick species (Mixson *et al.*, 2006; Trout Fryxell and DeBruyn, 2016). Thus, our results seemed to be rather due to natural co-infections with a *Rickettsia* spp. in those field samples, than cross-reactions. Finally, the *Amblyomma variegatum* sample positive for *Rickettsia* spp. was also positive for *Rickettsia africae*. This

sample originated from Guadeloupe, where *Rickettsia africae* circulates, thus in agreement with a good specificity of this amplification (Parola *et al.*, 1999).

The *Borrelia* spp. design was developed to target spirochetes belonging to the Lyme Disease Group as well as the Relapsing Fever Group. The design was able to detect all the *Borrelia* spp. tested here: *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia lonestari*, *Borrelia parkeri*, *Borrelia turicatae* and *Borrelia recurrentis*. However, the *Neoehrlichia mikurensis* sample (tick DNA naturally infected) was also positive for *Borrelia* spp. We tried to sequence the real-time PCR fragment obtained with the design developed for the Biomark analysis, however, the amplicon length was too small, only 73 bp, to obtain an interpretable sequence without prior cloning, further confirmation is needed to determine the nature of this unexpected signal.

All the *Bartonella* species tested here were detected when using the *Bartonella* spp. design: *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. But the *Rickettsia amblyommii* control which corresponds to a *Amblyomma americanum* sample naturally infected was also amplified. We tried to sequence the real-time PCR fragment obtained with the design developed for Biomark purpose. We obtained a 116 bp sequence, presenting 99% of sequence identity with the *ssrA* gene of *Bartonella henselae* (Table 3). Even if few is known concerning the role of ticks in *Bartonella* epidemiology, as *Bartonella* spp. has already been detected in *Amblyomma americanum*, this result may suggest a co-infection in the *Rickettsia amblyommii* control sample tested here (Billeter *et al.*, 2008).

The design *Anaplasma* spp. was able to detect all the *Anaplasma* spp. tested here: *Anaplasma platys*, *Anaplasma marginale*, and *Anaplasma phagocytophilum*. But the design gave also positive results when testing the *Ehrlichia canis* sample (culture) and two of the three tested *Neoehrlichia mikurensis* samples (blood of infected rodent blood and tick extract naturally infected). Three sequences were obtained after sequencing of the PCR products from the two *Neoehrlichia mikurensis* and *Ehrlichia canis* samples (Table 3). These sequences presented between 98 to 100% of sequence identity with the 16S rRNA gene of *Anaplasma* spp.. However, when aligned on the *Ehrlichia* database of the NCBI, these sequences gave also 96 to 99% of identity (with 99% of coverage) with *Neoehrlichia mikurensis* and *Ehrlichia canis* sequences. Thus, further confirmations are needed to determine if the unexpected amplifications noted here were due to cross-reactions or again co-infections. But, as specific design targeting *Neoehrlichia mikurensis* and *Ehrlichia canis* are included in the Biomark system, results interpretation should not be compromised.

*Ehrlichia* spp. primers were able to detect all the five *Ehrlichia* species tested here: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ruminantium*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* and the *Panola Mountain Ehrlichia*. The design also allowed the detection of the closely related *Neoehrlichia mikurensis*.

*Mycoplasma* spp. design was only tested on a plasmid containing the targeted sequence, and displayed a very low level of sensitivity, with a positive Cp value close to the cut off. This suggests that this design would not be enough sensitive to detect natural infection, and should be improved.

*Wolbachia* spp. design was developed in order to check if those endosymbiotic bacteria known to affect their vector arthropods and modulate pathogens transmission may be detected in Caribbean ticks (Plantard *et al.*, 2012). The design was tested on a plasmid containing the targeted sequence and gave a positive result. However, one of the *Neoehrlichia mikurensis* positive control corresponding to a tick extract was also positive for *Wolbachia* spp.. *Wolbachia* spp. have been described in several ticks, such as *Ixodes ricinus* (Plantard *et al.*, 2012). As the sample corresponds to a tick extract, this result may suggest a natural occurrence of those bacteria instead of a cross reaction. However, further confirmations are needed.

The design targeting the Apicomplexa phylum was developed in order to detect the main tick-borne parasitic genera such as *Babesia* spp., *Theileria* spp., and also *Hepatozoon* spp., *Cytauxzoon* spp., and *Rangelia vitalii*. This design was able to detect all the positive controls used for the test: *Babesia divergens*, *Babesia microti*, *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*, *Theileria parva*, *Theileria annulata*, *Theileria lestoquari* and *Hepatozoon canis*. The design gave also positive results when tested the following samples: *Rickettsia massiliae* (culture), *Anaplasma marginale* (blood sample of an experimentally infected cow), the three *Neoehrlichia mikurensis* samples (one blood from infected rodent and two tick samples naturally infected), *Panola Mountain Ehrlichia*, *Borrelia lonestari* (both from infected *Amblyomma americanum* tick samples) and *Rhipicephalus sanguineus* (tick sample collected in the field). We tried to sequence the real-time PCR fragment obtained with the design developed for the Biomark system. We obtained sequences between 58 and 104 bp, all presenting between 97-100% of sequence identity with Apicomplexa sequences. No significant homology was obtained when tested the nucleotide database of the pathogen represented by the control positive (Table 3). Finally, *Rhipicephalus sanguineus* ticks are involved in tick-borne parasites epidemiology including *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. (Aktas and Özübek, 2017; Chao *et al.*, 2017). Furthermore, the *Rhipicephalus sanguineus*

sample was also positive with *Hepatozoon* spp., *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* design, suggesting strongly the occurrence of such parasite in the biological sample. The unexpected amplifications noted here seemed to be due to natural (co)-infections of the samples with parasites rather than cross reactions.

Unexpectedly, *Theileria* species tested here were not detected when using the *Theileria* spp. design. This was surprising as this design was validated during a previous study when tested on dilution range of positive control by real-time PCR using LightCycler480. Several designs allowing the detection of the phylum, some genera and species of parasites used the same target, the 18S rRNA gene. This could cause an overcrowding at the hybridization site, leading to a competition between the primers for their fixation on the targeted sequence, and thus a decreased in the sensitivity of one design, here the *Theileria* spp. one.

*Hepatozoon* spp. primers were able to detect the *Hepatozoon canis* positive control. Two further samples were positive for *Hepatozoon* spp: *Neoehrlichia mikurensis* (blood of infected rodent) and *Rhipicephalus sanguineus* (tick collected from the field). As explained earlier, these samples were also positive for Apicomplexa, supporting the parasite occurrence hypothesis. A sequence of 169 bp was obtained from the *Neoehrlichia mikurensis* sample (rodent blood) after sequencing of the *Hepatozoon* spp. PCR product, displaying 99% of identity with 18S sRNA sequences of *Hepatozoon* spp. (Table 3). As rodents could be infected by *Hepatozoon* parasite, this result could reflect a natural infection (Hamšíková *et al.*, 2016).

*Leishmania* spp. primes were able to detect the two *Leishmania* species tested, *Leishmania infantum* and *Leishmania martiniquensis*. No cross reaction was identified with the other pathogens tested in this assay.

358 Table 3: Taxonomic assignation of the sequences obtained after sequencing of PCR products to confirm specificity of the genera designs. (AN: Accession number, %  
359 I: Percentage of identity, % C: Percentage of coverage).

Tested sample	Target	Length	Closest homology	% I	% C	AN	Comments
<i>Panola Mountain Ehrlichia</i>	<i>Rickettsia</i> spp. gltA gene (Regnery <i>et al.</i> , 1991)	382	<i>Rickettsia</i> spp.	99	100	GQ302942.1	No homology with <i>Ehrlichia</i> spp.
<i>Rickettsia amblyommii</i>	<i>Bartonella</i> spp. ssrA (This study)	116	<i>Bartonella henselae</i>	99	100	HG969191.1	No homology with <i>Rickettsia</i> spp.
<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Anaplasma</i> spp. 16S rRNA gene (This study)	160	<i>Anaplasma</i> spp.	98	100	KT264188.1	<i>Ehrlichia canis</i> 96% Id / 99% Co (KX987326.1)
<i>Neoehrlichia mikurensis</i> 5	<i>Anaplasma</i> spp. 16S rRNA gene (This study)	160	<i>Anaplasma</i> spp.	100	100	KY391803.1	<i>Neoehrlichia mikurensis</i> 99% Id / 99% Co (MF351962.1)
<i>Neoehrlichia mikurensis</i> 8	<i>Anaplasma</i> spp. 16S rRNA gene (This study)	112	<i>Anaplasma</i> spp.	98	100	AF536828.1	<i>Neoehrlichia mikurensis</i> 98% Id / 99% Co (MF805389.2)
<i>Rickettsia massiliae</i>	Apicomplexa 18s rRNA gene (This study)	104	<i>Babesia</i> spp., <i>Theileria</i> spp.	100	100	KY952238.1	<i>Rickettsia</i> sp. 72% Id / 68% Co (EU283841.1)
<i>Neoehrlichia mikurensis</i> 5	Apicomplexa 18s rRNA gene (This study)	58	<i>Babesia</i> spp., <i>Theileria</i> spp.	97	100	JQ928930.1	No homology with <i>Neoehrlichia</i> spp.
<i>Neoehrlichia mikurensis</i> 7	Apicomplexa 18s rRNA gene (This study)	58	<i>Theileria</i> sp. NG-2012b	100	100	JQ928930.1	No homology with <i>Neoehrlichia</i> spp.
<i>Neoehrlichia mikurensis</i> 8	Apicomplexa 18s rRNA gene (This study)	94	<i>Theileria</i> sp. NG-2012b	100	100	JQ928930.1	No homology with <i>Neoehrlichia</i> spp.
<i>Panola Mountain Ehrlichia</i>	Apicomplexa 18s rRNA gene (This study)	59	<i>Theileria</i> spp. ( <i>T. cervi</i> )	98	100	JQ928930.1	No homology with <i>Ehrlichia</i> spp.
<i>Anaplasma marginale</i>	Apicomplexa 18s rRNA gene (This study)	104	<i>Theileria</i> sp. NG-2012b	100	99	JQ928930.1	No homology with <i>Anaplasma</i> spp.
<i>Borrelia lonestari</i>	Apicomplexa 18s rRNA gene (This study)	102	<i>Theileria</i> spp. ( <i>T. cervi</i> )	98	100	KC162907.1	<i>Borrelia hispanica</i> sp. 79% Id / 59% Co (GQ202260.1)
<i>Neoehrlichia mikurensis</i> 5	<i>Hepatozoon</i> spp. 18s rRNA gene (This study)	169	<i>Hepatozoon</i> spp.	99	100	MF541372.1	No homology with <i>Neoehrlichia</i> spp.

### ***Designs targeting bacterial and parasitic species***

Specific primers and probes were designed to detect 60 TBPs species (Table 1). However *Borrelia burgdorferi*, *Candidatus Rickettsia amblyommii* and *Borrelia turicatae* were removed from the study as they were not able to detect their positive controls using Taqman real-time PCR. We evaluated the specificity of the remaining design using 92 TBPs positive controls with the Biomark system (Figure 1).

Results demonstrated high specificity for 41 primers/probe sets after pre-amplification, using a Cp cut-off of 30 (Figure 1). The following targets were not detected in the ticks while their corresponding positive controls were detected: *Rickettsia akari*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazekii*, *Borrelia anserina*, *Borrelia bissettii*, *Borrelia theileri*, *Borrelia lonestari*, *Borrelia parkeri*, *Bartonella vinsonii* subsp. *Berkhoffii*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia ruminantium*, *Ehrlichia canis*, *Parola Mountain Ehrlichia*, *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis*, *Coxiella burnetii* (two sets of design), *Francisella tularensis* (two sets of design), *Neoehrlichia mikurensis*, *Aegyptianella pullorum*, *Babesia gibsoni*, *Babesia bovis*, *Babesia duncani*, *Theileria equi*, *Theileria mutans*, *Theileria velifera*, *Hepatozoon canis*, *Leishmania infantum* (Donovani complex), *Cytauxzoon felis*, and *Rangelia vitalii*. In contrast, *Rickettsia africae* and *Hepatozoon canis* gave positive results with the *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus sanguineus* samples. As these tick samples are ticks collected from the field, and are known vectors of those pathogens, the results suggest that our designs were actually capable of detecting pathogens present in naturally-infected ticks rather than giving an unsuspected cross-reaction (Parola *et al.*, 1999; Aktas and Özübek, 2017).

Among the remaining designs, 15 gave unexpected results.

Several designs cross-reacted with closely related pathogen species. *Rickettsia andenae* cross-reacted with *Candidatus Rickettsia amblyommii*. *Rickettsia massiliae* cross-reacted with *Rickettsia andenae* and *Rickettsia slovaca*; *Rickettsia conorii* cross-reacted with *Rickettsia slovaca*; *Rickettsia felis* cross-reacted with *Candidatus Rickettsia amblyommii*. *Bartonella henselae* and *Bartonella bacilliformis* cross-reacted reciprocally. *Babesia canis vogeli* cross-reacted with *Babesia canis rossi*. *Babesia microti* cross-reacted with *Babesia canis rossi*. *Theileria parva* cross-reacted with *Theileria annulata* and *Theileria lestoquari*. *Hepatozoon americanum* cross-reacted with *Hepatozoon canis*.



For some designs, cross-reactions might correspond to co-infections. The design *Rickettsia felis* gave positive results with *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Panola Mountain Ehrlichia*, *Borrelia lonestari* samples. As these samples were also positive with *Rickettsia* spp., this supports the fact that a *Rickettsia* species may be present in these samples, being *Rickettsia felis* or *Candidatus Rickettsia amblyommii*, that are known to infect *Amblyomma americanum* ticks (Jiang *et al.*, 2009). In addition, *Hepatozoon americanum* and *Hepatozoon canis* gave positive results when testing *Neoehrlichia mikurensis* (infected rodent blood) and *Rhipicephalus sanguineus* samples, which were also positive with the *Hepatozoon* spp. design. This confirmed that these samples are co-infected with *Hepatozoon* parasites. *Babesia bigemina* design gave positive reactions with *Anaplasma marginale* positive control. *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* are two cattle pathogens, and as the positive control corresponded to a blood sample of experimentally infected cow. This cross-reaction could be the reflect of co-infections with these pathogens. *Mycoplasma ovis* and *Mycoplasma haemocanis* presented the same profile of cross-reactions. They gave positive results when testing *Anaplasma platys*, *Rickettsia slovaca* and *Bartonella henselae* samples. Because *Mycoplasma ovis* and *Mycoplasma haemocanis* designs were tested only on plasmid constructions, the co-occurrence of signals could be cross-reaction between the two closely related species. The control *Anaplasma platys* is a dog blood sample, and because *Mycoplasma haemocanis* is also a canine pathogen, this unexpected signal could be a co-infection. The two other controls, *Rickettsia slovaca* and *Bartonella henselae* are bacterial cultures. As *Mycoplasma* spp., they are known culture contaminants, suggesting that these designs may be able to detect contamination in culture samples (Drexler and Uphoff 2002). This observation could also explain the unexpected positive results obtained with the *Mycoplasma wenyonii* design when testing the culture samples of *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae*.

For one design, the cross-reaction observed is not clear. *Babesia caballi* gave unsuspected positive result with the culture of *Borrelia valaisiana*. This may suggest a non-specific detection signal or a contamination of the sample during experiment.

*Babesia ovis* and *Rickettsia rickettsii* designs gave multiple positive results, cross-reacted with numerous close species, and are thus considered as non-specifics and need further improvement. *Rickettsia parkeri* design was able to detect only one of the two positive controls tested, with high Cp, meaning that the efficiency of the design needs to be improved.

### *Designs for molecular identification of ticks*

The tick spp. design was developed in order to control the quality of both DNA and RNA extracted from tick samples. When using the Biomark system the design was able to detect *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus sanguineus* samples. However, high Cp values were observed and the design was not able to detect *Rhipicephalus microplus* samples. These primers were not added to the pre-amplification mix. Indeed, as the objective of the pre-amplification PCR is to enrich pathogen DNA content, we excluded the designs targeting ticks DNA from the assay. But, the Tick spp. design targets the mitochondrial 16S rRNA gene. The low quantity of such DNA in samples may explain the low efficiency of detection (Shao and Barker, 2007). Finally, following those results, the primers targeting the mitochondrial 16S rRNA gene were added to the pre-amplification mix used for the screening of TBPs in the Caribbean ticks (analyses are following). We obtained correct amplifications for all the tick samples analyzed, confirming the extraction control capacity of this design, at least for *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus microplus*, and *Rhipicephalus sanguineus*.

The specific designs developed for *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus microplus*, and *Rhipicephalus sanguineus* molecular identification were able to detect their corresponding positive control. The *Rickettsia conorii* positive sample that corresponded to DNA extracted from *Rhipicephalus sanguineus* tick, gave also a positive results with the tick species associated design, confirming therefore the reliability of those designs.

To conclude, most of the designs were specific of their target. As the specificity assay were based on the use of various samples such as cultures, blood samples, infected tick samples, plasmids, the heterogeneity of matrices complicates the interpretation of the assay. For some designs, further confirmations are needed to determine the nature of unsuspected results, and to conclude between potential cross-reactions, non-specific signals or co-infections. However, non-specific signals can be identified with the concomitant use of the bacterial and parasitic genera. Moreover, most of the cross-reactions with highly (?) concentrated bacterial or parasitic cultures displayed late Cp values, suggesting that those signals may not occurred when using field samples.

## Screening of TBPs in ticks from Guadeloupe and Martinique

A total of 597 adults were collected from Guadeloupe and Martinique. Among them, 137 were morphologically identified as *Amblyomma variegatum*, only collected in Guadeloupe, and 460 as *Rhipicephalus microplus*, including 175 from Guadeloupe and 285 from Martinique. 538 samples (some ticks were pooled) were tested using the Biomark system developed in this study. Nine samples were removed from the screening of pathogens due to an inconsistency between morphological and molecular identification of tick samples. Furthermore, in accordance to the microbial profile observed, the molecular identification was able to correct the morphological identification of three samples.

**Table 4: Number of positive ticks *Amblyomma variegatum* (out of the 137), *Rhipicephalus microplus* from Guadeloupe (out of 166) and Martinique (out of 281). IR: Infection rate. As some samples of *Rhipicephalus microplus* were pooled, we present minimum and maximum infection rates of infected ticks.**

	Guadeloupe		Martinique
	<i>Amblyomma. variegatum</i> (IR)	<i>Rhipicephalus microplus</i> min – max (IR)	<i>Rhipicephalus microplus</i> min – max (IR)
<i>Anaplasma spp.</i>	0	8 (4.8%) - 9 (5.4%)	112 (39.9%) - 116 (41.3%)
<i>Anaplasma marginale</i>	0	6 (3.6%) - 8 (4.8%)	111 (39.5%) - 116 (41.3%)
<i>Anaplasma ovis</i>	0	0	1 (0.4%)
<i>Ehrlichia spp.</i>	11 (8%)	7 (4.2%) - 11 (6.6%)	134 (47.7%) - 138 (49.1%)
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	7 (5.1%)	0	0
<i>Borrelia spp.</i>	7 (5.1%)	1 (0.6%) - 1 (0.6%)	12 (4.3%)
<i>Mycoplasma haemominutum</i>	1 (0.7%)	0	0
<i>Mycoplasma wenyonii</i>	1 (0.7%)	4 (2.4%) - 6 (3.6%)	6 (2.1%) - 7 (2.5%)
<i>Rickettsia spp.</i>	135 (98.5%)	26 (15.7%) - 39 (23.5%)	0
<i>Rickettsia africae</i>	131 (95.6%)	0	0
<i>Rickettsia conorii</i>	1 (0.7%)	1 (0.6%)	2 (0.7%)
<i>Rickettsia felis</i>	1 (0.7%)	0	0
<i>Hepatozoon spp.</i>	0	0	1 (0.4%)
<i>Leishmania spp.</i>	0	0	3 (1.1%)
<b>Apicomplexa</b>	<b>29 (21.2 %)</b>	<b>36 (21.7%) - 49 (29.5%)</b>	<b>62 (22.1%) - 64 (22.8%)</b>
<i>Theileria mutans</i>	2 (1.5%)	3 (1.8%) - 4 (2.4%)	4 (1.4%)
<i>Theileria velifera</i>	58 (42.3%)	40 (24.1%) - 53 (31.9%)	72 (25.6%) - 73 (26%)
<i>Babesia bigemina</i>	0	1 (0.6%) - 2 (1.2%)	35 (12.5%) - 36 (12.8%)
<i>Babesia bovis</i>	0	0	2 (0.7%)
<i>Babesia canis vogeli</i>	0	1 (0.6%) - 2 (1.2%)	13 (4.6%) - 14 (5%)
<i>Babesia microti</i>	1 (0.7%)	0	2 (0.7%)

## ***Tick-borne pathogens detected in Amblyomma variegatum from Guadeloupe***

Among the 137 *Amblyomma variegatum* ticks collected in Guadeloupe, we were able to detect pathogens known to occur in the Caribbean, such as *Ehrlichia ruminantium*, *Rickettsia africae*, *Theileria velifera*, and *Theileria mutans*, suggesting a high level of detection capacity of the assay for these pathogens. In addition, we occasionally detected at low unexpected pathogens like *Borrelia* spp., *Rickettsia felis*, *Rickettsia conorii* and the parasite *Babesia microti*. The number of positive ticks and corresponding infection rates for each genus and species pathogen are presented in Table 4.

### ***Rickettsia* spp.**

Among the 137 *Amblyomma variegatum* ticks collected in Guadeloupe, 98.5% were positive for *Rickettsia* spp., with 95.6% being positive for *Rickettsia africae* (Table 4). The four remaining samples that were not positive for *Rickettsia africae*, displayed high Cp value with the design *Rickettsia* spp.. As the genera design seemed to be more sensitive compared to the specific design targeting the bacterial species, these samples are also possibly infected with *Rickettsia africae*. This is the higher infection rate of *Rickettsia africae* in *Amblyomma variegatum* ticks ever reported within the Caribbean. Indeed, previous studies reported 27% of infected ticks (27/100) in Guadeloupe (Parola *et al.*, 1999), 56% (7/12) in Martinique (Parola *et al.*, 2003), 62.4% (63/101) in Antigua (Robinson *et al.*, 2009), 50% (9/18) in US Virgin Islands, 40% (2/5) in Montserrat, 7% (1/14) in St. Lucia, 9% (8/92) in Dominica, 20% (46/227) in St Kitts and 50% (17/34) in Nevis (Kelly *et al.*, 2010). In addition to the heterogeneity of the sampling (such as different numbers of ticks collected, different periods of collection, different host origins of the ticks, etc....), differences of infection rates may be due to a difference in terms of sensitivity of the assay used. The previous studies used conventional PCR technologies that may have a lower sensitivity than the Biomarker system using real-time PCR assays with Taqman probes. Finally, the high level of *Rickettsia africae* infection in *Amblyomma variegatum* is not so surprising, as this tick species can transmit transstadially and transovarially these bacteria, with a transovarial transmission efficacy estimated at 100% (Socolovshi *et al.*, 2009). Thus, *Amblyomma variegatum* is not only a vector of *Rickettsia africae* but also a natural reservoir (Kelly *et al.*, 2010) of the bacteria. *Rickettsia africae* is a human pathogen, responsible of African Tick Bite Fever that is in most of the cases a benign vector-borne disease but can occasionally shift to severe complications

like neuropathy or myocarditis (Maina *et al.*, 2014). Additionally to tick infections, *Rickettsia africae* were also reported in sera from sheep, goat, bovine and human, with seroprevalences ranging from 7% to 62%, confirming that these bacteria are able to infect ruminants and humans in the Caribbean (Parola *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 2010). Surprisingly, very few cases of human rickettsiosis have been reported in the region and exclusively in Guadeloupe. During the 1960s, few cases of rickettsiosis were reported after a tick bite, associated to *Amblyomma variegatum* larvae or nymph. *Rickettsia conorii*, responsible of Mediterranean spotted fever, was first incriminated (Morel *et al.*, 1967). However, numerous case of ATBF were misidentified and confounded with Mediterranean spotted fever since *Rickettsia africae* were only lately identify, in the 1990s. To date, only two cases of ATBF have been confirmed in French travelers after a tick bite in Guadeloupe (Parola *et al.*, 1998; Raoult *et al.*, 2001). As the virulence capacity of *Rickettsia africae* could be linked to bacterium variants, it could be interesting to genotype the strains that are present in Guadeloupe and more widely in the Caribbean (Maina *et al.*, 2014).

Two males *Amblyomma variegatum* were positive for *Rickettsia conorii* and *Rickettsia felis*, presenting high Cp values and in co-infection with *Rickettsia africae* among others (Table 4). *Rickettsia felis* is responsible of human rickettsiosis, mainly transmitted by cat's fleas, *Ctenocephalides felis*, and was reported in the Caribbean (Kelly *et al.*, 2010b). This pathogen can be encountered in ticks in endemic area, especially in *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Oliveira *et al.*, 2008). To date, at least in the Caribbean, *Amblyomma variegatum* have never been associated to *Rickettsia felis* epidemiology. Although suspected, the presence of *Rickettsia conorii* in the Caribbean has never been confirmed, and was certainly misidentified with *Rickettsia africae* (Morel *et al.*, 1967; Parola *et al.*, 1998). *Rickettsia conorii* is responsible of Mediterranean spotted fever, a mild to severe rickettsiosis usually transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* (Parola *et al.*, 2013). Thus the real presence of these two unexpected *Rickettsia* species in *Amblyomma variegatum* deserve further confirmations since late amplifications may be due to cross-reactions on conserved regions of the highly prevalent *Rickettsia africae*.

### ***Ehrlichia* spp.**

8% of the *Amblyomma variegatum* ticks were positive for *Ehrlichia* spp., with 5.1% being positive for *Ehrlichia ruminantium* (Table 4). The seven ticks positive for *Ehrlichia ruminantium* came from 4 different herds and 5 different animals. *Ehrlichia ruminantium* causes heartwater (cowdriosis) a potentially lethal disease in ruminants. This bacterium is an

obstacle to the development of the for livestock industry, limiting the importation of more productive but less resistant cattle breed in endemic countries (Allsopp *et al.*, 2015). Fortunately, in the Caribbean, *Ehrlichia ruminantium* is restricted to three areas, Guadeloupe, Marie-Galante and Antigua. *Ehrlichia ruminantium* infection rate in the *Amblyomma variegatum* ticks from this study was lower compared to the ones reported between 2003 and 2005 in Guadeloupe (37%, 51/139) and Marie-Galante (33.3%, 26/136), but similar to Antigua (5.8%, 7/121) (Vachiéry *et al.*, 2008). The reasons for such differences are unknown and warrant further investigations. In contrast to *Rickettsia africae*, *Ehrlichia ruminantium* is not considered to be transmitted transovarially in *Amblyomma variegatum*, that consequently do not support their role as a reservoir of the infection (Allsopp, 2015). As *Ehrlichia ruminantium* is responsible of heartwater, a severe bovine infection, it could be interesting to see if the apparent decrease in tick infection rates in Guadeloupe results from a decrease in Heartwater reports and/or linked to improvement in control and prevention strategy of such disease. As ruminants are reservoir of *Ehrlichia ruminantium*, serosurvey study of *Ehrlichia ruminantium* infections in cattle should be perform in Guadeloupe to evaluate a potential decrease of bacteria prevalence on the Islands.

Five samples were only positives for *Ehrlichia* spp., with low Cp values, suggesting unspecific signals or the potential presence of another *Ehrlichia* species in our samples that deserve further investigations (Table 4).

### ***Borrelia* spp.**

5.1% of the tick samples were positive for *Borrelia* spp.. None of the specific *Borrelia* species targeted gave any positive results (Table 4). As the *Borrelia* spp. design allows the detection of both the Lyme disease and the relapsing fever *Borrelia* more investigations are required in order to identify which *Borrelia* species are present in our samples. *Borrelia* spp. has been recently detected in *Amblyomma variegatum* ticks in Ethiopia, *flaB* and *16S rRNA* sequences sharing homology with both the relapsing fever and Lyme disease groups (Kumsa *et al.*, 2015). As *Amblyomma variegatum* ticks were introduced in the Caribbean from Africa, accompanied by its associated TBPs, it would be interesting to determine the presence of *Borrelia* spp. in our tick samples, and to compare them with these recently described African *Borrelia*.

### ***Mycoplasma* spp.**

Two samples of male *Amblyomma variegatum* were positive for *Candidatus* *Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma wenyonii* (Table 4). *Candidatus* *Mycoplasma haemominutum* is a cat pathogen, its occurrence in *Amblyomma variegatum*, especially specimens collected on cattle, is unexpected and need further investigation. *Mycoplasma wenyonii* is a bovine pathogen. These bacteria have been reported in Cuba, but no data is available concerning its circulation in other islands of the Caribbean and its association to tick and more particularly to *Amblyomma variegatum* (Rodriguez *et al.*, 1989). The occurrence of these two pathogens in our samples needs further confirmations. Indeed, we cannot exclude that their presence in our engorged ticks, may simply result from contaminated blood meals.

### **Apicomplexa, *Theileria* and *Babesia* species**

1.2 % of the ticks were positive for Apicomplexa and 42.3% were positive for *Theileria velifera* (Table 4). Unfortunately, the positivity for Apicomplexa and *Theileria velifera* were not always consistent. This may be due to the fact that the two designs have the same target, the 18S rRNA gene, leading maybe to interference during pre-amplification of the DNA samples. Two samples were also positive for *Theileria mutans*, in co-infection with *Theileria velifera*. *Theileria mutans* and *Theileria velifera* are bovine parasites usually transmitted by *Amblyomma variegatum*. The first one can be responsible of mild theileriosis, and the last one is considered as non-pathogenic. Co-infections of these two parasites are common in cattle in endemic regions of Africa (Berggoetz *et al.*, 2014). References to these parasites in the Caribbean are quite old, and no prevalence studies, neither in ticks nor in cattle have been conducted since then (Morel *et al.*, 1967; Uilenberg *et al.*, 1983; Rodriguez *et al.*, 1989). Both of them are transstadially transmitted by *Amblyomma variegatum*, and no transovarial transmission occurs (Nene *et al.*, 2016). As ticks are not reservoir of these parasites, asymptomatic bovine should act as long-term carriers of the infections (Abdela and Bekele, 2016). The lack of pathogenicity of these piroplasms may explain the few information available concerning their distribution and prevalence in the Caribbean. However, those parasites species may be important in theileriosis management. Indeed recent study suggests that cattle chronically infected with *Theileria velifera* and/or *Theileria mutans* develop immunity and heterologous protection against other pathogenic *Theileria* species, such as *Theileria parva* (Woolhouse *et al.*, 2015).

Finally, one sample was positive for *Babesia microti*, with high Cp value, and also in co-infections with *Theileria velifera* (Table 4). This result is unexpected since *Babesia microti* is

a human pathogen transmitted by *Ixodes* spp. with rodent reservoir in the Northern hemisphere (Yabsley and Shock, 2013). There again, further confirmation is required to determine the real occurrence of *Babesia microti* in our samples.

### ***Tick-borne pathogens detected in Rhipicephalus microplus ticks from Guadeloupe and Martinique.***

Among the 175 and 285 *Rhipicephalus microplus* ticks from Guadeloupe and Martinique respectively, we were able to detect pathogens known to occur in the Caribbean including *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* (the last one only in ticks from Martinique). In addition, we detected several unexpected pathogens, some with high infection rates, such as *Ehrlichia* spp., and *Theileria velifera*, and some pathogens detected occasionally, such as *Borrelia* spp., *Mycoplasma wenyonii*, *Theileria mutans*, and *Babesia canis vogeli*. Finally, some pathogens were detected only in one of the two islands, such as *Rickettsia* spp. in Guadeloupe, and *Anaplasma ovis*, *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., and *Babesia microti* in Martinique. The number of positive ticks and corresponding infection rates for each genus and species pathogen are presented in Table 4.

#### ***Anaplasma* spp.**

*Rhipicephalus microplus* from both islands were positive for *Anaplasma* spp. and *Anaplasma marginale*, but with different infection rates. Between 4.8 to 5.4% and 39.9 to 41.3% of the *Rhipicephalus microplus* from Guadeloupe and Martinique respectively were positive for *Anaplasma* spp. (Table 4). Most of the positive samples *Anaplasma* spp. were also positives for *Anaplasma marginale*. However, consistency between the two designs decreased when Cp values increased. *Anaplasma marginale* is a known bovine pathogen transmitted transstadially by *Rhipicephalus microplus* in the Caribbean. Previous studies reported seroprevalences in cattle of the Lesser Antilles ranging from 1% to 68%, with 43% to 55% in Martinique and 1% to 2% in Guadeloupe (Camus and Montenegro-James, 1994; Camus and Barre, 1995; Alonso *et al.*, 1992). In this study, we report a lower *Anaplasma marginale* infection rate in ticks from Guadeloupe than in ticks from Martinique. In Guadeloupe, *Anaplasma marginale* positive ticks were collected on three of the 20 animals sampled (belonging to three different livestock). In Martinique, *Anaplasma marginale* positive ticks were collected on 24 of the 29 animals sampled (belonging to 24 different



livestock). Together with seroprevalence data, these results suggest that *Anaplasma marginale* could be more prevalent in Martinique than in Guadeloupe. The cattle breed has an effect on anaplasmosis prevalences. Indeed, the main cattle breed occurring in Guadeloupe is the local Creole that is more resistant to anaplasmosis than the Brahman breed that is mainly present in Martinique (Camus and Montenegro, 1994).

*Anaplasma ovis* were found in one female *Rhipicephalus microplus* from Martinique, and in co-infection with *Anaplasma marginale* (Table 4). *Anaplasma ovis* is mainly a pathogen of goat and sheep, transmitted by *Dermacentor* spp.. However, it has been recently reported in *Rhipicephalus microplus* from Madagascar, co-infections with *Anaplasma marginale* among others *Anaplasma* spp. (Matysiak *et al.*, 2016). *Anaplasma ovis* is pathogenic for small ruminants but is also able to infect bovine, without inducing clinical symptoms (Ochirkhuu *et al.*, 2017). As *Anaplasma ovis* has never been reported in the Caribbean, its confirmation in our sample is required.

Finally, four and 22 samples from Guadeloupe and Martinique respectively were only positive for *Anaplasma* spp. (Table 4). These results may be due to a variable sensitivity between genera and species designs, or suggest the presence of another *Anaplasma* species than the ones targeted by the Biomark system. More particularly, the presence of the non-pathogenic *Anaplasma centrale*, another bovine bacteria usually found in co-infection with *Anaplasma marginale* in African bovines, should be investigated (Matysiak *et al.*, 2016).

#### ***Ehrlichia* spp.**

*Rhipicephalus microplus* from both islands were positive for *Ehrlichia* spp., with infection rates of 4.2 – 6.6% in Guadeloupe and 47.7– 49.1% in Martinique (Table 4). None of the specific *Ehrlichia* species targeted by the Biomark system gave positive results, suggesting the presence of another *Ehrlichia* species in our samples. Interestingly, a new *Ehrlichia* cattle pathogen have been recently described in *Rhipicephalus microplus* ticks from Canada, Brazil and French Polynesia, named *Ehrlichia minasensis* (*E. mineirensis*) (Aguilar *et al.*, 2014; Cabezas-Cruz *et al.*, 2016; Laroche *et al.*, 2016). Further studies are needed to determine if *Ehrlichia minasensis* could be the agent detected in our samples.

#### ***Borrelia* spp.**

Similarly to *Amblyomma variegatum* collected in Guadeloupe, *Rhipicephalus microplus* from both islands were positive for *Borrelia* spp., with infection rates of 0.6% in

Guadeloupe and 4.3% in Martinique (Table 4). None of the specific *Borrelia* species targeting by the Biomark system gave positive results. However, *Borrelia burgdorferi* design, was invalidated, and thus we cannot exclude the presence of these *Borrelia* species in our samples. Indeed, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto has already been described in China in *Rhipicephalus microplus* ticks, suggesting that this tick could be involved in the epidemiology of Lyme disease spirochetes (Hou *et al.*, 2015). Similarly, the presence of relapsing fever spirochetes deserves more investigations. Spirochetes closely related to *Borrelia theileri*, responsible of bovine borreliosis transmitted by *Rhipicephalus microplus* ticks, were described in the same tick species in Brazil (Yparraguirre *et al.*, 2007). Further studies are needed to identify the *Borrelia* spp. occurring in our samples, in both *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus microplus* ticks.

#### ***Mycoplasma* spp.**

*Mycoplasma wenyonii* has been detected in *Rhipicephalus microplus* from both islands with quite similar infection rates, of 2.4-3.6% in Guadeloupe and 2.1-2.5% in Martinique (Table 4). As for *Mycoplasma wenyonii* detected in *Amblyomma variegatum* ticks, its presence in our sample must be confirmed. Ticks are suspected to participate in the epidemiology of *Mycoplasma* spp., but no vector competence study has been conducted yet. As we detected these bacteria in two different tick species (although not collected on the same host or livestock), we cannot exclude that *Mycoplasma* spp. if presents, may be part of traces of blood meal still present in engorged ticks collected on bovines.

#### ***Rickettsia* spp.**

*Rickettsia* spp. were found only in *Rhipicephalus microplus* ticks collected in Guadeloupe, with a quite high infection rate, of 15.7 – 23.5% (Table 4). None of the specific *Rickettsia* species targeting by the Biomark system gave positive results. Interestingly, 21 of the 26 positive tick samples were collected on the same animal than *Rickettsia africae* positive *Amblyomma variegatum* ticks. As *Rickettsia africae* seems to be highly prevalent in *Amblyomma variegatum* ticks in Guadeloupe, and as bacteria circulate in bovine, other tick species, such as *Rhipicephalus microplus*, that are feeding on the same animal could be also contaminated. This has been demonstrated in a study evaluating *Rickettsia africae* infections in ticks from the Union of the Comoros. 2% and 65.17% of *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma variegatum* were found positive for *Rickettsia africae* respectively, all the ticks

collected on the same animals (Yssouf *et al.*, 2014). However, tick collected on host may be engorged, thus further studies are needed to determine if detected bacteria are really able to infect and replicate in this *Rhipicephalus microplus*. In our study, *Rhipicephalus microplus* were not found positive for *Rickettsia africae* using the Biomark system. However, samples positive for *Rickettsia* spp. displayed quite high Cp values, suggesting a low level of infections. As the specific design targeting *Rickettsia africae* seems to be less sensitive than the design targeting *Rickettsia* genera in this study, the infection may be too low to be detected with it. Confirmations are required to determine if *Rickettsia africae* is the *Rickettsia* species present in *Rhipicephalus microplus* from Guadeloupe.

One and two samples of *Rhipicephalus microplus* collected in Guadeloupe and Martinique respectively were found positive for *Rickettsia conorii*. These samples displayed high Cp values, and were not positive for *Rickettsia* spp., suggesting preferentially a non-specific amplification.

#### **Apicomplexa**

21.7 – 29.5% and 22.1 – 22.8% of the *Rhipicephalus microplus*, collected in Guadeloupe and Martinique respectively, were positive for Apicomplexa, suggesting a significant occurrence of these parasites in our tick samples (Table 4).

#### ***Theileria* spp.**

*Theileria velifera* was found in 24.1 – 31.9% and 25.6 – 26% of the *Rhipicephalus microplus*, collected in Guadeloupe and Martinique respectively (Table 4). As previously noted, unfortunately the positivity for Apicomplexa and *Theileria velifera* were not always consistent, probably due to a reactional bias of the two designs during sample pre-amplification. *Theileria velifera* have been also detected in one *Rhipicephalus microplus* tick from Mozambique, but similarly to *Rickettsia africae*, *Rhipicephalus microplus* is not known to be vector of this parasitic species (Matsimbe *et al.*, 2017). Some positive tick samples were collected on the same animal than *Amblyomma variegatum* ticks positives for *Theileria velifera*. These results suggest that parasites may be circulating in cattle but can also be detected in the collected tick blood meal (Matsimbe *et al.*, 2017). However, in this study *Theileria velifera* infection rates in *Rhipicephalus microplus* were quite high in both islands, with Cp values similar to the ones found in *Amblyomma variegatum*, suggesting that the vector or reservoir role of this tick species deserve further investigation.

Three and four samples of *Rhipicephalus microplus* were found positives for *Theileria mutans*, with high Cp values (Table 4). Positive samples were also co-infected with *Theileria velifera*, as it was noticed with infected *Amblyomma variegatum*. Similarly to *Theileria velifera*, the real presence of *Theileria mutans* in this unusual tick species should be confirmed.

#### ***Babesia* spp.**

*Babesia bigemina* was found in 0.6 – 1.2% and 12.5 – 12.8% of the *Rhipicephalus microplus* collected in Guadeloupe and Martinique respectively, with 30 samples on 35 total samples also positives for Apicomplexa design (Table 4). *Babesia bovis* was only found in 0.7% of the *Rhipicephalus microplus* collected in Martinique (Table 4). Those samples were also positive for Apicomplexa design. The two parasites are responsible for bovine babesiosis, an endemic disease in the Caribbean, where they are both transmitted by *Rhipicephalus microplus* ticks. In the 1990s, seroprevalences in bovine sera reached 35 - 38% and 69 - 72% for *Babesia bovis*, 49 - 58% and 47 - 50% for *Babesia bigemina* in Guadeloupe and Martinique respectively (Camus and Montenegro-James, 1994; Camus and Barre, 1995). However, to date no data on infection rates in ticks of the Caribbean are available. *Babesia bigemina* seems to be more prevalent in ticks from Martinique than in Guadeloupe. In Guadeloupe, *Babesia bigemina* positive ticks were collected on 1 out of the 20 animals sampled. In Martinique, *Babesia bigemina* positive ticks were collected on 7 of the 29 animals sampled (belonging to 7 different herds). Thus, the number of samples is too low to exclude any sampling bias that could explain these differences in infection rates. Moreover, in contrast to anaplasmosis, both cattle breeds do not influence babesiosis in the French Antilles, where both Creole and Brahman breed display resistance to babesiosis (Camus and Montenegro-James, 1994). Finally, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* infection rates in *Rhipicephalus microplus* ticks could have been underestimated. Indeed, *Babesia bigemina* is mainly transmitted by nymphs of *Rhipicephalus microplus* and secondarily by adults (Alonso *et al.*, 1992). As well, *Babesia bovis* is mainly transmitted by larvae of *Rhipicephalus microplus*, and infective form do not persist beyond larvae stage (Bock *et al.*, 2004). However, in this study we only analyzed adult tick specimens, thus decreasing the probability of parasites detection. TBPs screening on larvae or nymphs of *Rhipicephalus microplus* should be implemented, especially when evaluating infection rate in tick.

0.6 – 1.2% and 4.6 – 5% of *Rhipicephalus microplus* were positive for *Babesia canis vogeli* in Guadeloupe and Martinique, respectively (Table 4). Although the infection rate

observed in Martinique seemed to be higher than the one in Guadeloupe, the ticks were collected only on four different animals. *Babesia canis vogeli* is a canine pathogen usually transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* ticks. However, this pathogen has been detected in 37% (15/41) of cattle blood samples, and in goat and sheep blood samples from several Caribbean islands (Li *et al.*, 2015). Detection in the main cattle tick species occurring in the area could explain the circulation of such unexpected pathogens in ruminant's blood. However, further investigations are required. Additionally to result confirmations, it could be interesting to investigate the potential vector competence of this tick species for dog's pathogens, and to determine the link between epidemiological cycles involving dogs and bovines.

*Babesia microti* has been detected in two ticks in Martinique, collected on two different animals/livestock (Table 4). However, Cp values were high, close to the limit of detection, suggesting that they could result from non-specific amplifications.

#### ***Hepatozoon spp. and Leishmania spp.***

Finally, one and three *Rhipicephalus microplus* from Martinique were positive for *Hepatozoon* spp. and *Leishmania* spp. (Table 4). None of the specific species targeted by the Biomark system reacted, such as *Hepatozoon canis* or *Leishmania infantum*, two canine pathogens associated to the *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Dantas-Torres, 2010). These results could suggest that other or new parasitic species belonging to *Hepatozoon* and *Leishmania* genera, adapted to cattle, could be present in our tick samples. Finally, confirmations are required to determine the presence of these unexpected parasites.

#### ***PCR and sequencing to confirm results for the Biomark system***

The confirmation of the results obtained with the Biomark system is the challenging part of the study, especially due to the sensitivity level of the technology and the occurrence of co-infections in tick samples (Michelet *et al.*, 2014; Moutailler *et al.*, 2016).

During specificity analysis of the designs used in this study, we observed unexpected cross-reactions, potentially identified as co-infections, especially when naturally tick samples were tested as control. As few volumes of positive controls DNA were available, we could not test all of them by conventional PCR. Thus, we tried to sequence the real-time PCR products obtained with the design tested here. The amplicon length was the main issue here. The

maximum length of amplicon authorized when using Biomark system is 200 bp. For amplicon with length above 100 bp we were able to analyze the sequences. However, amplicons with shorter sequences, below 100bp were (1) not readable - nevertheless, cloning small amplicons before sequencing could improve the quality of the sequences and should be tested - (2) not enough informative, indeed small amplicon sequences corresponded to primers and probes sequences, as the oligonucleotide lengths were about 20-30 bp.

We tried to confirm results obtained with the Biomark system regarding the screening of TBPs in ticks collected in Guadeloupe and Martinique (Table 3).

We confirmed the presence of *Ehrlichia ruminantium*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* with real-time PCR protocols routinely used in our reference laboratory. Five of the seven samples positive for *Ehrlichia ruminantium* were confirmed by real-time PCRs targeting specifically the *pCS20* gene (Supplementary data 2). However, the real-time PCR used for confirmation displayed Cp values higher than the ones obtained with the Biomark system (around 10 Cp of difference), explaining the lack of detection of two samples by single real-time PCR. *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* positive samples were confirmed by duplex SYBR Green real-time PCR targeting the *cytB* gene of those parasites (Supplementary data 3). *Babesia bigemina* was not confirmed in only one sample, but as the Biomark Cp value was high, the level of *Babesia* infection in this sample may have been under the detection threshold of the duplex real-time PCR.

Finally, we tried then to confirm all the other pathogens detected with conventional PCR targeting conserved genes of the bacterial and parasitic genera detected in this study (Table 3). However, for the majority of the samples tested we did not obtained amplification, and for the ones we sent to sequencing, the majority of the sequences were not readable. The main issue here is the level of sensitivity. Indeed, the Biomark protocol is based on real-time PCRs and include a pre-amplification step, this suggest that the level of sensitivity is certainly higher than conventional PCRs. Another issue is the presence of co-infections. For example, confirming the presence of *Rickettsia felis* or *Rickettsia conorii* in *Amblyomma variegatum* ticks co-infected with *Rickettsia africae* using PCR protocols targeting the *Rickettsia* genus could be challenging. The high level of *Rickettsia africae* infection may hide the presence of others *Rickettsia* species in the sample.

To conclude, we need to implement new confirmation protocols, including nested-PCRs, or species specific real-time PCRs targeting different genes than the ones targeted by the Biomark system if we want to be able to reach the level of sensitivity of our new technology developed in this study, and to be also able to confirm co-infections.

## Discussion

In this study, we developed a high-throughput detection tool based on the use of multiple primers/probes allowing large scale surveillance of the main bacteria and parasites transmitted by ticks in the Caribbean. The association of genus and species designs targeting TBPs improved the screening capacity of the technology, allowing not only the detection of infectious agents known to circulate in the studied area, but also new or unsuspected pathogens.

Except for *Theileria* spp. and *Mycoplasma* spp. that need to be improved, all the genus and phylum designs were able to detect their corresponding positive controls. Some of the designs gave unexpected results with samples corresponding to naturally infected blood or tick extracts. In most of the cases, these apparent cross-reactions were potentially identified as natural co-infections (Moutailler *et al.*, 2016). Genus designs allowed the detection of the main bacterial and parasitic pathogens transmitted by ticks, but they may also detect potentially new and endosymbiotic microorganisms. Indeed ticks may harbor endosymbiotic bacterial species that belong to genera including also known TBPs, such as the *Rickettsia* and *Coxiella* genus (Ahtarig *et al.*, 2013; Duron *et al.*, 2015; Bonnet *et al.*, 2017). Thus, in the case of non-associated species detection, confirmations are still required before suggesting the presence of a pathogenic microorganism. Cross-reactions have been observed for some of the species specific designs, and must be taken into account when interpreting results. Due to high design constraints and a lack of available sequences in public databases, the improvement of such cross-reacting oligonucleotides remain challenging. Although tested on a non-exhaustive list of controls, most of the designs targeting specific species included in the Biomark system appeared to be highly specific.

The high-throughput detection tool was used for the investigation of TBPs in ticks collected in Guadeloupe and Martinique. This large-scale screening gave a comprehensive overview of the epidemiological situation of 55 TBPs, and explored the diversity of microorganisms belonging to the main bacteria and parasite transmitted by ticks. The system was able to detect known pathogens of medical and veterinary importance and unexpected TBPs.

*Amblyomma variegatum* ticks collected in Guadeloupe were found positive for their associated TBPs including *Ehrlichia ruminantium*, *Rickettsia africae*, *Theileria velifera* and *Theileria mutans*. As well, *Rhipicephalus microplus* were found positive for *Anaplasma*

*marginale*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*. Except for *Rickettsia africae*, where ticks are known reservoirs of the infection, asymptomatic cattle are long-term carrier of these bacteria and parasites, explaining that despite control measures, they are still present on the islands (Camus and Montenegro-James, 1994; Kelly *et al.*, 2010; Allsopp, 2015; Abdela and Bekele, 2016). Unexpectedly, *Rickettsia* species, *Theileria velifera* and *Theileria mutans* were also found in *Rhipicephalus microplus* ticks. Tick host may play a central role in the epidemiological meaning of this result. Indeed, *Rhipicephalus microplus* contrary to *Amblyomma variegatum*, are not considered as vector of *Rickettsia africae* or *Theileria velifera* and *Theileria mutans*. But both tick species may share the same meal, feeding on the same animal, explaining the presence of these pathogens. Additionally, ticks collected on the host are most of the time engorged and traces of blood meal may still persist in the tick's midgut. Thus, when screening pathogens in such ticks, we need to keep in mind, especially when unexpected detection occurs, that detected pathogens might come from the host blood but are not actually be able to replicate into ticks, or to be transmitted by them (Estrada-Peña *et al.*, 2013; Matsimbe *et al.*, 2017).

Finally, we detected unexpected pathogens in ticks from Guadeloupe and Martinique. *Anaplasma ovis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia felis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Mycoplasma wenyonii*, *Babesia microti*, *Babesia canis vogeli* were found occasionally. Except for *Rickettsia conorii*, that can be transmitted by *Amblyomma variegatum* species, but whose presence in the Caribbean is not proven, all the other pathogens are usually found in other part of the world, in other vectors, or associated to other vertebrate hosts. The originality of such results, associated to the recent development of this new detection tool, highlight the need for confirmations. Indeed, we cannot exclude potential cross-reactions with close species, such as *Rickettsia africae*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia conorii*; or *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale*. We cannot also exclude non-specific amplifications, especially when Cp values are high. In addition, some unexpected results were obtained with genus designs, *Ehrlichia* spp. *Hepatozoon* spp. and *Leishmania* spp. in *Rhipicephalus microplus* ticks and *Borrelia* spp., in both tick species from the two islands. These interesting results deserve further investigation. Indeed, as none of the specific species targeted with the Biomark system gave positive results, these amplifications might be due to the presence of new microorganisms, or unsuspected species, not reported yet in the Caribbean. Nevertheless, although screening tools are useful for pathogen discovery in ticks, the epidemiological meaning of such results warrants further investigations. Detecting pathogen DNA in ticks



does not necessarily mean that the tick is involved in the pathogen life cycle and it cannot replace vector competence studies (Estrada-Peña *et al.*, 2013).

To conclude, we demonstrated the high ability of the technology to give a rapid overview of the diversity of TBPs of veterinary and medical importance present in ticks from the Caribbean. This high-throughput tool is a major improvement in TBPs surveillance study, allowing a rapid screening especially in regions where few epidemiological data are available.

## Aknowledgments

This publication was funded by grants from The French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety CoVetLab grant (ANSES) and the French Agricultural Research and International Cooperation Organization (CIRAD). This work was performed under the framework of the EurNegVec COST Action TD1303. We thank the “Tiques et Maladies à Tiques (TMT)” group of the CNRS “Réseau Ecologie des Interactions Durables” for stimulating discussion and support.

## Author contributions

MG wrote the paper. MVT, EA, and SM reviewed the manuscript. EA and SM supervised the manuscript. ED, VP, RA contributed to sample preparation. SD contributed to technical support.

## References

- Abarca, K., López, J., Acosta-Jamett, G., Lepe, P., Soares, J. F., and Labruna, M. B. (2012). A third *Amblyomma* species and the first tick-borne *rickettsia* in Chile. *J. Med. Entomol.* 49, 219–222.
- Abdela, N., and Bekele, T. (2016). Bovine Theileriosis and its Control: A Review. *Advances in Biological Research* 10, 200–212. doi:10.5829/idosi.abr.2016.10.4.103107.
- Aguiar, D. M., Ziliani, T. F., Zhang, X., Melo, A. L. T., Braga, I. A., Witter, R., et al. (2014). A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 537–544. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.03.010.
- Ahantarig, A., Trinachartvanit, W., Baimai, V., and Grubhoffer, L. (2013). Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens). *Folia Microbiol. (Praha)* 58, 419–428. doi:10.1007/s12223-013-0222-1.
- Aktas, M., and Özübek, S. (2017). Transstadial Transmission of *Hepatozoon canis* by *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Field Conditions. *J. Med. Entomol.* 54, 1044–1048. doi:10.1093/jme/tjx050.
- Allsopp, B. A. (2015). Heartwater--*Ehrlichia ruminantium* infection. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 34, 557–

940 568.

941 Alonso, M., Arellano-Sota, C., Cereser, V. H., Cordoves, C. O., Guglielmone, A. A., Kessler, R., et al.  
942 (1992). Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the  
943 Caribbean. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 11, 713–733.

944 Barre, N., Garris, G. I., Borel, G., and Camus, E. (1988). Hosts and Population Dynamics of  
945 *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) on Guadeloupe, French West Indies. *J Med*  
946 *Entomol* 25, 111–115. doi:10.1093/jmedent/25.2.111.

947 Barré, N., and Uilenberg, G. (2010). Spread of parasites transported with their hosts: case study of two  
948 species of cattle tick. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 29, 149–160, 135–147.

949 Berggoetz, M., Schmid, M., Ston, D., Wyss, V., Chevillon, C., Pretorius, A.-M., et al. (2014). Tick-  
950 borne pathogens in the blood of wild and domestic ungulates in South Africa: Interplay of  
951 game and livestock. *Ticks and Tick-borne Diseases* 5, 166–175.  
952 doi:10.1016/j.ttbdis.2013.10.007.

953 Billeter, S. A., Levy, M. G., Chomel, B. B., and Breitschwerdt, E. B. (2008). Vector transmission of  
954 *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Medical and*  
955 *Veterinary Entomology* 22, 1–15. doi:10.1111/j.1365-2915.2008.00713.x.

956 Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., and Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129  
957 Suppl, S247-269.

958 Bonnet, S. I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A. M., and Duron, O. (2017). The Tick Microbiome:  
959 Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission.  
960 *Front Cell Infect Microbiol* 7, 236. doi:10.3389/fcimb.2017.00236.

961 Bonnet, S., Jouglin, M., Malandrin, L., Becker, C., Agoulon, A., L’hostis, M., et al. (2007).  
962 Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed  
963 on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology* 134, 197–207.  
964 doi:10.1017/S0031182006001545.

965 Buling, A., Criado-Fornelio, A., Asenzo, G., Benitez, D., Barba-Carretero, J. C., and Florin-  
966 Christensen, M. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of  
967 *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.* 147, 16–25. doi:10.1016/j.vetpar.2007.03.031.

968 Bunikis, J., Garpmo, U., Tsao, J., Berglund, J., Fish, D., and Barbour, A. G. (2004). Sequence typing  
969 reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North  
970 America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology (Reading, Engl.)* 150, 1741–1755.  
971 doi:10.1099/mic.0.26944-0.

972 Cabezas-Cruz, A., Zwegarth, E., Vancová, M., Broniszewska, M., Grubhoffer, L., Passos, L. M. F.,  
973 et al. (2016). *Ehrlichia minasensis* sp. nov., a new species within the genus *Ehrlichia* isolated  
974 from the tick *Rhipicephalus microplus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*  
975 doi:10.1099/ijsem.0.000895.

976 Camus, E., and Barre, N. (1995). Vector situation of tick-borne diseases in the Caribbean islands.  
977 *Veterinary Parasitology* 57, 167–176. doi:10.1016/0304-4017(94)03118-G.

978 Camus, E., and Montenegro-James, S. (1994). Bovine anaplasmosis and babesiosis in the Lesser  
979 Antilles: risk assessment of an unstable epidemiologic situation. *Vet. Res.* 25, 313–317.

980 Cangi N, Pinarello V, Bournez L, Lefrançois T, Albina E, Neves L, Vachieri N. Efficient high-  
981 throughput molecular method to detect *Ehrlichia ruminantium* in ticks. *Parasites & Vectors*,

- 982 *in press.*
- 983 Chao, L.-L., Liao, H.-T., Ho, T.-Y., and Shih, C.-M. (2017). First detection and molecular  
984 identification of *Babesia gibsoni* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Acta Tropica* 166,  
985 356–362. doi:10.1016/j.actatropica.2016.09.022.
- 986 Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*.  
987 *Parasites & Vectors* 3, 26. doi:10.1186/1756-3305-3-26.
- 988 Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., and Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: a One Health  
989 perspective. *Trends Parasitol.* 28, 437–446. doi:10.1016/j.pt.2012.07.003.
- 990 Drexler, H. G., and Uphoff, C. C. (2002). *Mycoplasma* contamination of cell cultures: Incidence,  
991 sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 39, 75–90.  
992 doi:10.1023/A:1022913015916.
- 993 Duron, O., Noël, V., McCoy, K. D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., et al. (2015). The  
994 Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of  
995 the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLOS Pathogens* 11, e1004892.  
996 doi:10.1371/journal.ppat.1004892.
- 997 Estrada-Peña, A., Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., and Nijhof, A. M. (2013). Research on the ecology  
998 of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats. *Front Cell Infect*  
999 *Microbiol* 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00029.
- 1000 George, J. E., Davey, R. B., and Pound, J. M. (2002). Introduced ticks and tick-borne diseases: the  
1001 threat and approaches to eradication. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 18, 401–416, vi.
- 1002 Gondard, M., Cabezas-Cruz, A., Charles, R.A., Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Moutailler, S. Ticks  
1003 and tick-borne pathogens of the Caribbean: current understanding and future directions for  
1004 more comprehensive surveillance. *In press*, submitted in *Frontiers in Cellular and Infection*  
1005 *Microbiology*.
- 1006 Hamšíková, Z., Silaghi, C., Rudolf, I., Venclíková, K., Mahříková, L., Slovák, M., et al. (2016).  
1007 Molecular detection and phylogenetic analysis of *Hepatozoon* spp. in questing *Ixodes ricinus*  
1008 ticks and rodents from Slovakia and Czech Republic. *Parasitol Res* 115, 3897–3904.  
1009 doi:10.1007/s00436-016-5156-5.
- 1010 Hornok, S., Földvári, G., Elek, V., Naranjo, V., Farkas, R., and de la Fuente, J. (2008). Molecular  
1011 identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies  
1012 (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 154, 354–  
1013 359. doi:10.1016/j.vetpar.2008.03.019.
- 1014 Hou, J., Ling, F., Chai, C., Lu, Y., Yu, X., Lin, J., et al. (2015). Prevalence of *Borrelia burgdorferi*  
1015 Ssensu Lato in Ticks from Eastern China. *Am J Trop Med Hyg* 92, 262–266.  
1016 doi:10.4269/ajtmh.14-0587.
- 1017 Jiang, J., Yarina, T., K Miller, M., Stromdahl, E., and L Richards, A. (2009). Molecular Detection of  
1018 *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma americanum* Parasitizing Humans. *Vector borne and*  
1019 *zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 10, 329–40. doi:10.1089/vbz.2009.0061.
- 1020 Kelly, P. J., Lucas, H., Eremeeva, M. E., Dirks, K. G., Rolain, J. M., Yowell, C., et al. (2010a).  
1021 *Rickettsia felis*, West Indies. *Emerg Infect Dis* 16, 570–571. doi:10.3201/eid1603.091431.
- 1022 Kelly, P., Lucas, H., Beati, L., Yowell, C., Mahan, S., and Dame, J. (2010b). *Rickettsia africae* in  
1023 *Amblyomma variegatum* and domestic ruminants on eight Caribbean islands. *J. Parasitol.* 96,

1024 1086–1088. doi:10.1645/GE-2552.1.

1025 Kumsa, B., Socolovschi, C., Raoult, D., and Parola, P. (2015). New *Borrelia* species detected in  
1026 ixodid ticks in Oromia, Ethiopia. *Ticks and Tick-borne Diseases* 6, 401–407.  
1027 doi:10.1016/j.ttbdis.2015.03.009.

1028 Laroche, M., Marie, J., Mediannikov, O., Almeras, L., Berenger, J.-M., Musso, D., et al. (2016). A  
1029 novel ehrlichial agent detected in tick in French Polynesia. *Ticks Tick Borne Dis* 7, 1203–  
1030 1208. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.07.014.

1031 Li, J., Kelly, P., Zhang, J., Xu, C., and Wang, C. (2015). Development of a pan-Babesia FRET-qPCR  
1032 and a survey of livestock from five Caribbean islands. *BMC Veterinary Research* 11.  
1033 doi:10.1186/s12917-015-0560-0.

1034 Maina, A. N., Jiang, J., Omulo, S. A., Cutler, S. J., Ade, F., Ogola, E., et al. (2014). High Prevalence  
1035 of *Rickettsia africae* Variants in *Amblyomma variegatum* Ticks from Domestic Mammals in  
1036 Rural Western Kenya: Implications for Human Health. *Vector Borne Zoonotic Dis* 14, 693–  
1037 702. doi:10.1089/vbz.2014.1578.

1038 Matsimbe, A. M., Magaia, V., Sanches, G. S., Neves, L., Noormahomed, E., Antunes, S., et al. (2017).  
1039 Molecular detection of pathogens in ticks infesting cattle in Nampula province, Mozambique.  
1040 *Exp Appl Acarol* 73, 91–102. doi:10.1007/s10493-017-0155-5.

1041 Matysiak, A., Dudko, P., Dudek, K., Dudek, M., Junkuszew, A., and Tryjanowski, P. (2016). The  
1042 occurrence of pathogens in *Rhipicephalus microplus* ticks from cattle in Madagascar.  
1043 *Veterinarni Medicina* 61, 516–523. doi:10.17221/59/2016-VETMED.

1044 Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., et al. (2014). High-  
1045 throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front Cell Infect Microbiol* 4.  
1046 doi:10.3389/fcimb.2014.00103.

1047 Mixson, T. R., Campbell, S. R., Gill, J. S., Ginsberg, H. S., Reichard, M. V., Schulze, T. L., et al.  
1048 (2006). Prevalence of *Ehrlichia*, *Borrelia*, and *Rickettsial* Agents in *Amblyomma americanum*  
1049 (Acari: Ixodidae) Collected from Nine States. *Journal of Medical Entomology* 43, 1261–  
1050 1268. doi:10.1603/0022-585(2006)43[1261:POEBAR]2.0.CO;2.

1051 Morel, P. C. (1967). Etudes sur les tiques du bétail en Guadeloupe et Martinique. II. Agents  
1052 pathogènes transmis par les tiques. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays*  
1053 *tropicaux* 20(2) : 291-299.

1054 Moutailler, S., Moro, C. V., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F. H., Devillers, E., et al. (2016). Co-  
1055 infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLOS Neglected Tropical Diseases*  
1056 10, e0004539. doi:10.1371/journal.pntd.0004539.

1057 Nene, V., Kiara, H., Lacasta, A., Pelle, R., Svitek, N., and Steinaa, L. (2016). The biology of *Theileria*  
1058 *parva* and control of East Coast fever – Current status and future trends. *Ticks and Tick-borne*  
1059 *Diseases* 7, 549–564. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.02.001.

1060 Ochirkhuu, N., Konnai, S., Odbileg, R., Murata, S., and Ohashi, K. (2017). Molecular Epidemiological  
1061 Survey and Genetic Characterization of *Anaplasma* Species in Mongolian Livestock. *Vector-*  
1062 *Borne and Zoonotic Diseases* 17, 539–549. doi:10.1089/vbz.2017.2111.

1063 Oliveira, K. A., Oliveira, L. S., Dias, C. C. A., Silva, A., Almeida, M. R., Almada, G., et al. (2008).  
1064 Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for  
1065 Brazilian Spotted Fever. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 191–194.

1066 Parola, P., Attali, J., and Raoult, D. (2003). First detection of *Rickettsia africae* on Martinique, in the  
1067 French West Indies. *Ann Trop Med Parasitol* 97, 535–537.  
1068 doi:10.1179/000349803225001382.

1069 Parola, P., Jourdan, J., and Raoult, D. (1998). Tick-borne infection caused by *Rickettsia africae* in the  
1070 West Indies. *N. Engl. J. Med.* 338, 1391. doi:10.1056/NEJM199805073381918.

1071 Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., et al.  
1072 (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin.*  
1073 *Microbiol. Rev.* 26, 657–702. doi:10.1128/CMR.00032-13.

1074 Parola, P., Vestris, G., Martinez, D., Brochier, B., Roux, V., and Raoult, D. (1999). Tick-borne  
1075 rickettsiosis in Guadeloupe, the French West Indies: isolation of *Rickettsia africae* from  
1076 *Amblyomma variegatum* ticks and serosurvey in humans, cattle, and goats. *Am. J. Trop. Med.*  
1077 *Hyg.* 60, 888–893.

1078 Plantard, O., Bouju-Albert, A., Malard, M.-A., Hermouet, A., Capron, G., and Verheyden, H. (2012).  
1079 Detection of *Wolbachia* in the Tick *Ixodes ricinus* is Due to the Presence of the Hymenoptera  
1080 Endoparasitoid *Ixodiphagus hookeri*. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0030692.

1081 Raoult, D., Fournier, P. E., Fenollar, F., Jensenius, M., Prioe, T., de Pina, J. J., et al. (2001). *Rickettsia*  
1082 *africae*, a Tick-Borne Pathogen in Travelers to Sub-Saharan Africa. *New England Journal of*  
1083 *Medicine* 344, 1504–1510. doi:10.1056/NEJM200105173442003.

1084 Regnery, R. L., Spruill, C. L., and Plikaytis, B. D. (1991). Genotypic identification of rickettsiae and  
1085 estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J.*  
1086 *Bacteriol.* 173, 1576–1589.

1087 Robinson, J. B., Eremeeva, M. E., Olson, P. E., Thornton, S. A., Medina, M. J., Sumner, J. W., et al.  
1088 (2009). New approaches to detection and identification of *Rickettsia africae* and *Ehrlichia*  
1089 *ruminantium* in *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) ticks from the Caribbean. *J. Med.*  
1090 *Entomol.* 46, 942–951.

1091 Rodriguez, O.N., Espaine, L., Rivas, A., and Rodriguez, P.. (1989b). Epidemiology of cattle diseases  
1092 caused by haemoparasites in Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias.* 20, 1, 37-56.

1093 Shao, R., and Barker, S. C. (2007). Mitochondrial genomes of parasitic arthropods: implications for  
1094 studies of population genetics and evolution. *Parasitology* 134, 153–167.  
1095 doi:10.1017/S0031182006001429.

1096 Socolovschi, C., Huynh, T. P., Davoust, B., Gomez, J., Raoult, D., and Parola, P. (2009). Transovarial  
1097 and trans-stadial transmission of *Rickettsia africae* in *Amblyomma variegatum* ticks. *Clin.*  
1098 *Microbiol. Infect.* 15 Suppl 2, 317–318. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02278.x.

1099 Trout Fryxell, R. T., and DeBruyn, J. M. (2016). The Microbiome of Ehrlichia-Infected and  
1100 Uninfected Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*). *PLoS One* 11.  
1101 doi:10.1371/journal.pone.0146651.

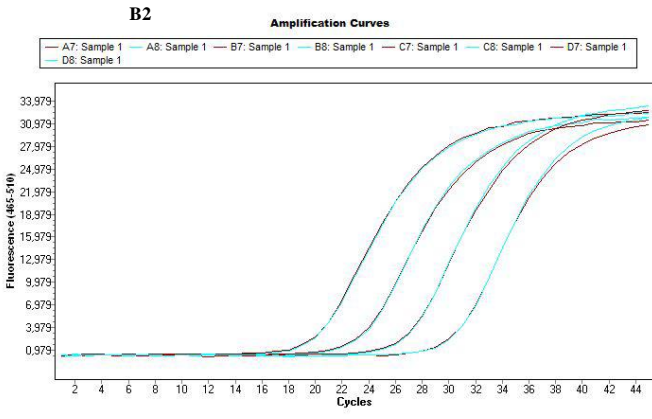
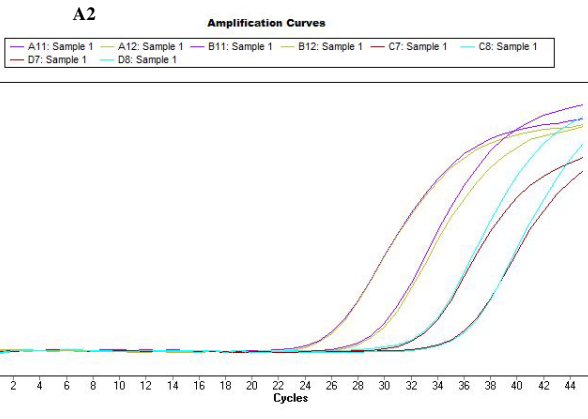
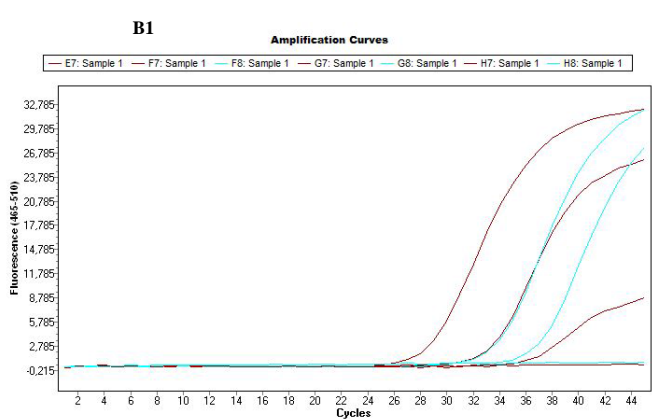
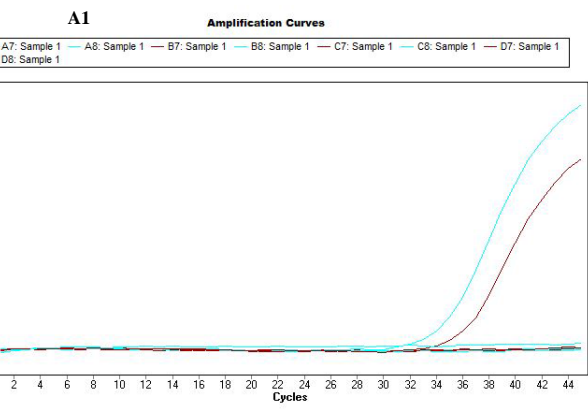
1102 Uilenberg, G., Camus, E., and Barré, N. (1983). [Existence of *Theileria mutans* and *Theileria velifera*  
1103 (Sporozoa, Theileriidae) in Guadeloupe (French West Indies)]. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*  
1104 36, 261–264.

1105 Vachiéry, N., Jeffery, H., Pegram, R., Aprelon, R., Pinarello, V., Kandassamy, R. L. Y., et al. (2008).  
1106 *Amblyomma variegatum* ticks and heartwater on three Caribbean Islands. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*  
1107 1149, 191–195. doi:10.1196/annals.1428.081.

- 1108 Vayssier-Taussat, M., Moutailler, S., Michelet, L., Devillers, E., Bonnet, S., Cheval, J., et al. (2013).  
 1109 Next Generation Sequencing Uncovers Unexpected Bacterial Pathogens in Ticks in Western  
 1110 Europe. *PLoS ONE* 8, e81439. doi:10.1371/journal.pone.0081439.
- 1111 Walker, A. R., Bouattour, A., Camicas, J.-L., Estrada-Pena, A., Horak, I. G., Latif, A. A., et al. (2003).  
 1112 *Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species*. illustrée. Wisconsin  
 1113 University- Madison. Bioscience Reports, Edinburgh, Scotland.
- 1114 Woolhouse, M. E. J., Thumbi, S. M., Jennings, A., Chase-Topping, M., Callaby, R., Kiara, H., et al.  
 1115 (2015). Co-infections determine patterns of mortality in a population exposed to parasite  
 1116 infection. *Science Advances* 1, e1400026. doi:10.1126/sciadv.1400026.
- 1117 Yabsley, M. J., and Shock, B. C. (2012). Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife  
 1118 reservoirs. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2, 18–31. doi:10.1016/j.ijppaw.2012.11.003.
- 1119 Yparraguirre, L. A., Machado-Ferreira, E., Ullmann, A. J., Piesman, J., Zeidner, N. S., and Soares, C.  
 1120 A. G. (2007). A hard tick relapsing fever group spirochete in a Brazilian *Rhipicephalus*  
 1121 (*Boophilus*) *microplus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7, 717–721. doi:10.1089/vbz.2007.0144.
- 1122 Yssouf, A., Socolovschi, C., Kernif, T., Temmam, S., Lagadec, E., Tortosa, P., et al. (2014). First  
 1123 molecular detection of *Rickettsia africae* in ticks from the Union of the Comoros. *Parasites &*  
 1124 *Vectors* 7, 444. doi:10.1186/1756-3305-7-444.

# **Supplementary data 1**

Test of primers/probe set sensitivity on a dilution range of positive controls by Taqman real-time PCRs using LightCycler 480, before and after pre-amplification. A1/A2: Test of sensitivity of the design *Leishmania infantum* using *Leishmania infantum* culture, before (A1) and after pre-amplification (A2); B1/B2: Test fo sensitivity of the design *Rickettsia* spp. using *Rickettsia andenae* positive controls (extract from infected wild tick), before (B1) and after pre-amplification (B2).



## **Supplementary data 2**

Qualitative comparison of *Ehrlichia ruminantium* detection ability between the Biomark system developed in this study, targeting *gltA* gene of *Ehrlichia ruminantium* and a recently developed real-time PCR system targeting *pCS20* gene of *Ehrlichia ruminantium*, routinely used by the reference laboratory for Heartwater (cowdriosis) at the CIRAD of Guadeloupe (Cangi N, Pinarello V, Bournez L, Lefrançois T, Albina E, Neves L, Vachiery N. Efficient high-throughput molecular method to detect *Ehrlichia ruminantium* in ticks. *Parasites & Vectors*, in press).

Samples	Cp Biomark system <i>gltA</i> gene	Cp real-time PCR <i>pCS20</i> gene
<b>B11-P1-82</b>	25.24	35.51
<b>B12-P1-90</b>	27.12	ND
<b>C1-P2-97</b>	25.74	ND
<b>F3-P2-116</b>	16.63	27.77
<b>H5-P2-134</b>	26.58	36.08
<b>F8-P2-156</b>	27.06	37.92
<b>H8-P2-158</b>	ND	39.34 (1/2)
<b>B9-P2-160</b>	23.36	37.08



1173 **Supplementary data 3**

1174 Qualitative comparison of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* detection ability between the  
 1175 Biomark system developed in this study, targeting *CCTeta* and *18S rRNA* genes of *Babesia*  
 1176 *bovis* and *Babesia bigemina* respectively and a CIRAD routinely used real-time SYBR green  
 1177 duplex PCR protocols used for bovine babesiosis diagnosis, targeting the *cytB* gene of those  
 1178 parasites.

Samples	Cp Biomark system 18S rRNA gene	Cp Biomark system CCTeta gene	Cp duplex real-time PCR cytB
B5-P3-222	14,70		14,54
C10-P3-263	27,59		32,39
D10-P3-264	17,52		19,60
F10-P3-266	21,42		24,39
G10-P3-267	23,75		26,65
H10-P3-268	18,62		20,40
A11-P3-269	19,83		22,54
B11-P3-270	25,70		26,83
C11-P3-271	19,39		21,69
D11-P3-272	20,80		23,89
E11-P3-273	21,83		25,03
F11-P3-274	25,68		29,10
G11-P3-275	20,81		23,68
H11-P3-276	27,99		29,89
A12-P3-277	20,58		23,20
B12-P3-278	21,78		25,10
C12-P3-279	22,30		24,43
D12-P3-280	22,00		25,65
D4-P4-310	28,26		35,89
E4-P4-311	17,07		19,95
F4-P4-312	25,31		27,41
H4-P4-314	15,21		17,87
A1-P5-377	25,16		32,28
A7-P5-425	22,77		29,47
C7-P5-427	25,25		29,32
C8-P5-435	24,60		32,29
H8-P5-440	23,59		28,99
C9-P5-443	26,57		ND
H9-P5-448	22,87		38,41
B5-P6-504	25,49		31,25
C6-P6-513	25,52		30,37
F6-P6-516	25,93		30,96
G6-P6-517	24,42		29,40
F8-P6-532	23,99		32,16
G8-P6-533	26,75		31,67
A9-P6-535	23,61		30,97
G1-P6-477		22,30	24,43
C4-P6-497		24,56	30,48



## Développement de la PCR microfluidique en temps réel

### « Bactérie/Parasite »

#### Capacité de dépistage à haut débit des genres et espèces bactériens et parasitaires d'intérêt sanitaire dans les tiques caribbéennes.

- Panel de detection: 43 espèces bactériennes, sept genres bactériens, 17 espèces parasitaires, trois genres parasitaires, un phylum parasitaire, et trois espèces de tique.
- 42 sets d'amorces/sondes validés:  
*Rickettsia akari*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazekii*, *Borrelia anserina*, *Borrelia bissettii*, *Borrelia theileri*, *Borrelia lonestari*, *Borrelia parkeri*, *Bartonella vinsonii* subsp. *Berkhoffii*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia ruminantium*, *Ehrlichia canis*, *Panola Mountain Ehrlichia*, *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis*, *Neoehrlichia mikurensis* *Coxiella burnetii* (deux sets Amorces/sondes), *Francisella tularensis* (deux sets Amorces/sondes), *Aegyptianella pullorum*, *Babesia gibsoni*, *Babesia bovis*, *Babesia duncani*, *Theileria equi*, *Theileria mutans*, *Theileria velifera*, *Hepatozoon canis*, *Leishmania infantum* (Donovani complex), *Cytauxzoon felis*, *Rangelia vitalii*, *Leishmania* spp., *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma variegatum*, Tick spp.
- 11 sets d'amorces/sondes validés mais qui peuvent croiser: *Rickettsia andenae*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, *Bartonella bacilliformis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia microti*, *Theileria parva*, *Hepatozoon americanum*, *Ehrlichia* spp.
- 13 sets d'amorces/sondes qui nécessitent confirmations (suspicion de co-infection): *Rickettsia felis*, *Babesia bigemina*, *Mycoplasma ovis*, *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma wenyonii*, *Babesia caballi*, *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp., *Bartonella* spp., *Anaplasma* spp., *Wolbachia* spp., *Apicomplexa*, *Hepatozoon* spp.
- 8 sets d'amorces/sondes non validés: *Babesia ovis*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia turicatae*, *Candidatus Rickettsia amblyommii*, *Mycoplasma* spp., *Theileria* spp.



## Criblage des bactéries et parasites dans les tiques des Antilles Françaises

- Détection des bactéries et parasites d'intérêt médical et vétérinaire connus pour être transmis par les tiques de Guadeloupe et de Martinique
  - *Amblyomma variegatum*: *Ehrlichia ruminantium*, *Rickettsia africae*, *Theileria mutans*, *Theileria velifera*
  - *Rhipicephalus microplus*: *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*.
- Détection d'agents pathogènes et microorganismes inattendus dans les tiques de Guadeloupe et de Martinique
  - *Amblyomma variegatum*: *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma wenyonii*, *Candidatus Mycoplasma Haemominutum*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia felis* et *Babesia microti*.
  - *Rhipicephalus microplus*: *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Mycoplasma wenyonii*, *Anaplasma ovis*, *Rickettsia conorii*, *Babesia microti*, *Babesia canis vogeli*, *Theileria velifera*, et *Theileria mutans*.
- Bilan
  - Technologie adaptée à l'investigation épidémiologique des bactéries et parasites présentes dans les tiques caribbéennes: identification spécifique des agents pathogènes d'intérêt sanitaire et détection de microorganismes nouveaux ou non suspectés.
  - Interprétation épidémiologique des résultats limitée par la nature de l'échantillonnage. Biais de détection possible dû à la collecte de tiques gorgées.
- Perspectives

Confirmations des résultats : mettre au point des protocoles de confirmation adaptés.

Identifier les espèces de *Borrelia*, *Ehrlichia*, *Hepatozoon*, et *Leishmania*.

# **CHAPITRE 2b**

## **Criblage des virus dans les tiques des Antilles Françaises**

## **Introduction**

A ce jour plus de 500 arbovirus ont été décrits au sein des arthropodes et parmi eux, environ 160 ont été identifiés dans les tiques. Les Arbovirus sont regroupés au sein de neuf familles virales : une famille de virus à ADN, les *Asfarviridae*, et huit familles de virus à ARN, les *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Nyamiviridae*, *Nairoviridae*, *Phenuiviridae*, et *Peribunyaviridae* (Kazimirova *et al.*, 2017). Seulement 25% des arbovirus transmis par les tiques sont pathogènes pour l'homme ou l'animal, et moins de 10 % des tiques connues à l'heure actuelle sont impliquées comme vecteurs, incluant des tiques molles des genres *Ornithodoros* et *Argas*, et des tiques dures des genres *Ixodes*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* et *Hyalomma* (Labuda and Nuttall, 2004).

Dans les Caraïbes, à l'exception de la Peste porcine Africaine (African swine fever virus, ASFV) décrit à Cuba, à Haiti, et en République Dominicaine dans les années 1970s suite à une épidémie de cas d'hémorragies sévères chez les suidés, aucun autre virus transmis par les tiques d'importance médicale ou vétérinaire n'a été rapporté (Butler and Gibbs, 1984; Penerith, 2009). Quelques virus ont été ponctuellement décrits, associés en majorité aux tiques parasitant les oiseaux marins, tels que l'Estero real virus, Hugues virus, Soldado virus, mais aucune étude de pathogénicité n'a été menée pour ces virus (Aitken 1968; Jonkers *et al.*, 1973 ; Danielová *et al.*, 1982 ; Malkova *et al.*, 1985).

Ainsi, l'un des objectifs de ma thèse était de rechercher la présence potentielle de virus pathogènes transmis par les tiques caribéennes.

Dans ce chapitre du manuscrit consacré à la détection à haut débit des virus transmis par les tiques, je présente en premier lieu le développement de la puce de détection des arbovirus d'importance médicale et vétérinaire auquel j'ai participé à mon arrivée en thèse. Cet outil de détection a été validé sur des échantillons de tiques *Ixodes ricinus* collectés dans cinq pays d'Europe, et les résultats de cette étude sont présentés ci-après sous la forme d'un article en cours de soumission.

En deuxième partie de ce chapitre, je présenterai l'adaptation de la puce de détection des arbovirus à ma zone d'étude que sont les Caraïbes, et les résultats du criblage des virus d'intérêt dans les échantillons de tiques de Guadeloupe et de Martinique.

## **1. Développement de la PCR microfluidique en temps réel à haut débit permettant le criblage des arbovirus dans les tiques**

Lors de mon intégration au sein de l'équipe ANSES de Maisons-Alfort en début de thèse, une puce de détection basée sur la PCR microfluidique en temps réel permettant le criblage des arbovirus, d'importance médicale et vétérinaire de répartition mondiale, était en cours de développement.

Les designs permettant la détection de 22 virus transmis par les tiques avaient déjà été mis au point et leur sensibilité testée sur des témoins positifs (ARN issus de culture de virus, ARN issus de tiques naturellement infectées, Plasmides contenant la séquence d'intérêt). Je me suis chargée du développement des sondes/amorces permettant à la fois de confirmer la bonne extraction des ARN et de confirmer l'identification des tiques étudiées, *Ixodes ricinus* et *Ixodes persulcatus*.

La validation de la puce de détection a été réalisée via l'analyse de tiques de terrain, correspondant à 19 305 nymphes d'*Ixodes ricinus* collectées dans cinq pays d'Europe incluant la Suède, la France, le Royaume-Uni, le Danemark et les Pays-Bas. J'ai réalisé l'analyse des échantillons de tiques de France à l'aide de la puce de détection des arbovirus nouvellement développée. Finalement j'ai participé à la mise au point des protocoles de confirmation des résultats obtenus à l'aide de la puce.

Le développement et la validation de la méthode de détection à haut débit des virus sur les tiques européennes a fait l'objet d'un article, en cours de soumission, disponibles ci-après.

## High-throughput screening of tick-borne viruses in European ticks

Gondard Mathilde<sup>1#</sup>, Michelet Lorraine<sup>1#</sup>, Nisavanh Athinna<sup>1</sup>, Devillers Elodie<sup>1</sup>, Delannoy Sabine<sup>2</sup>, Fach Patrick<sup>2</sup>, Aspan Anna<sup>3</sup>, Chirico Jan<sup>4</sup>, Hoffman Bernd<sup>5</sup>, van der Wal Fimme Jan<sup>6</sup>, Jahfari Seta<sup>7</sup>, Sprong Hein<sup>7</sup>, Mansfield Karen L<sup>8</sup>, Klitgaard Kirstine<sup>9</sup>, Bødker Rene<sup>9</sup>, Moutailler Sara<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, ANSES, INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France;

<sup>2</sup> IdentityPath Platform, Food Safety Laboratory, ANSES, Maisons-Alfort, France;

<sup>3</sup> Department of Bacteriology, National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden;

<sup>4</sup> Department of Virology, Immunobiology and Parasitology, National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden;

<sup>5</sup> Institut of Virus diagnosis, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald - Insel Riems, Germany;

<sup>6</sup> Department of Infection Biology, Central Veterinary Institute, Wageningen UR, Lelystad, the Netherlands;

<sup>7</sup> Laboratory for Zoonoses and Environmental Microbiology, National Institute for Public Health and Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands;

<sup>8</sup> Wildlife Zoonoses and Vector Borne Disease Research Group Animal and Plant Health Agency (APHA), ..., UK;

<sup>9</sup> National Veterinary Institute, DTU, Copenhagen, Denmark.

# Authors have contributed equally to this work

\*Correspondance: Sara Moutailler, UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, ANSES, 14 Rue Pierre et Marie Curie 94706 Maisons-Alfort, France ; [sara.moutailler@anses.fr](mailto:sara.moutailler@anses.fr)

**Keywords: Tick borne viruses; molecular epidemiology; surveillance; Europe; microfluidic analysis.**

### Abstract

*Ixodes ricinus* is the most widespread and abundant tick species, and the main vector of bacteria, parasites and viruses of medical and veterinary importance in Europe. While epidemiological knowledge is growing on tick-borne bacteria, few is known concerning the prevalence and distribution of arboviruses transmitted by ticks in European countries. In this study we implemented a high-throughput real-time PCR technology allowing the concomitant monitoring of 22 tick-borne virus of sanitary importance in ticks. This detection tool is based on the use of dynamic array, which performed 2304 amplifications in one run, thus allowing

the simultaneous detection of 22 viruses in 47 cDNA tick samples. We validated the epidemiological performance of the technology with the first high-throughput screening of arboviruses in *Ixodes ricinus* ticks collected in Five European countries including France, Sweden, Netherlands, Denmark, and UK. Among the targeted viruses, we detected the tick-borne encephalitis virus (TBEV) and Uukuniemi (UUKV) in tick from Sweden; UUKV and Eyach virus (EYV) in ticks from Netherlands; and a nairovirus-like in ticks from France and Netherlands. Thus we demonstrated the high detection performance of the real-time microfluidic PCR, which allowed us to explore the epidemiological situation of 22 main TBVs in tick from Europe. The tool is easily adaptable to any area of study, time saving, require few amount of RNA, and thus represent an important technological improvement for epidemiological research on vector-borne pathogens.

## 1. Introduction

Ticks are the primary vectors of human and animal infectious diseases in Europe before mosquitoes, and are able to transmit a wide range of bacteria, parasites and viruses [1]. Among the 900 tick species worldwide, *Ixodes ricinus* present the largest repartition and highest abundance among European ticks and is able to engorge on several hosts [2, 3]. *I. ricinus* transmit several pathogens on medical and veterinary importance as the spirochetes from the *Borrelia* genus responsible of Lyme Borreliosis, the bacteria *Anaplasma phagocytophilum* responsible of human granulocytic anaplasmosis (HGA), parasites from the *Babesia* genus responsible of piroplasmosis and tick-borne viruses (TBVs) as Tick-borne encephalitis virus (TBEV), Louping ill virus, Uukuniemi virus, Kemerovo and Eyach virus [3-6].

Whereas bacteria and parasites incidence in animals, humans, and ticks are well studied worldwide, less information are available regarding viruses. Environmental changes, human travel and animal transportation lead to the emergence and/or the extension of several tick-borne pathogens (TBPs) worldwide including viruses [4, 7-9]. Several TBVs have already emerged in new territories, such as TBEV, Louping ill virus, Powassan virus, Deer tick virus, and Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) [10-12], while novel ones are constantly discovered [13-17]. These facts highlight the importance of monitoring TBVs prevalence in tick populations in Europe.

When TBEV prevalence in ticks in Europe is well reviewed, others TBVs are less registered [18-21]. More than 500 arboviruses exist worldwide [22] with at least 160 TBVs



classified into nine different families : one DNA viral family, *Asfarviridae*, and eight RNA viral families, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, the newly recognized *Nyamiviridae* (order *Mononegavirales*), and the families *Nairoviridae*, *Phenuiviridae* and *Peribunyaviridae* in the new order, *Bunyavirales* [6, 63]. Usually, TBV prevalence are estimated by RT-PCRs or real-time RT-PCRs (rRT-PCR) targeted specific viruses known (or suspected) to be present in the collected tick species [19]. This approach could present an important disadvantage regarding the limited number of different viruses that can be tested, given the quantity of RNA required for one RT-PCR or rRT-PCR. Being able to detect in a high number of ticks a high number of viruses in one experiment, will improve subsequently the epidemiological survey of TBVs.

Indeed, in our study, we conduct a high-throughput monitoring of TBVs in *I. ricinus* nymphs collected in five European countries. Therefore, we developed a novel high-throughput surveillance method to identify 22 major worldwide TBVs. This tool utilizes a microfluidic system (BioMark™ dynamic array system, Fluidigm) that is capable of performing 2,304 individual real-time PCRs using 48.48 chips [23]. In a single experiment, 47 ticks or pools of ticks can be tested for the presence of 22 viruses, as well as confirmation of the tick species. A similar system was already developed with success to screen 37 TBPs (bacteria and parasites) [23]. In our study, we applied this new method to screen 19,305 *I. ricinus* collected from five European countries; Sweden, France, UK, Denmark, and the Netherlands. We demonstrated increased surveillance efficiency of TBVs, and improved monitoring of the emerging diseases important to public and animal health.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area and tick collection

A total of 19,305 *Ixodes ricinus* nymphs, from 5 different countries: France, Sweden, Denmark, the Netherlands, and UK; were studied. Questing nymphs were collected using the flagging technique (Vassallo *et al.*, 2000) in one location in UK and in three different locations in the four other countries in May 2013. Forty-five pools of 33 nymphs were collected per site. In France, ticks were collected from Murbach (M) (47.918N; 7.146E), Autheux (A) (50.157N; 2.241E), and Senart forest (S) (48.677N; 2.484E). In Denmark, ticks were collected from Vestskoven Bidstrup (BIS) (55.560N; 11.879E), Åbenrå (AAB) (55.052N; 9.383E) and Kalø (KAL) (56.290N; 10.472E). In the Netherlands, ticks were collected from Austerlitz (A) (52.083N; 5.300E), Duin en Kruidberg (D) (52.430N; 4.615E)

and Kuinderbos (K) (52.783N; 5.810E). In Sweden ticks were collected from Hindens rev nature reserve (HR) (58.573489N, 12.914171E), Morga Hage nature reserve (MH) (59.751964N, 17.641640E), and Ramsvikslandets nature reserve (RV) (58.419921N, 11.249814E). In the UK, ticks were collected from Richmond Park, Surrey (UK) (51.4427N; -0.2837E). To confirm the presence of Eyach virus in the Netherlands, *I. ricinus* ticks were collected from five locations in the province of Overijssel, Netherlands. A total of 291 adults and 1167 nymphs were collected and regrouped into 434 pools (2 adults/pool and  $\pm 20$  nymphs/pool).

## 2.2. RNA extraction

Ticks were morphologically identified to species level (Pérez-Eid, 2007) and preserved at -80°C. After washing once in 70% ethanol for 5 min and twice in distilled water for 5 min, pools were crushed in 300  $\mu$ l of DMEM with 10% fetal calf serum and six steel balls using the homogenizer Precellys®24 Dual (Bertin, France) at 5500 rpm for 20 seconds.

RNA was then extracted using the Nucleospin RNA II extract kit (Macherey-Nagel, Germany) using 100 $\mu$ L of the homogenate. 200 $\mu$ L were conserved at -80°C for back-up. Total RNA per sample was eluted in 50  $\mu$ l of RNase free water and stored at -80°C until further use.

## 2.3. Primers and Probe Design

Tick-borne viruses, targeted genes and primers/probe sets are listed in Table 1. For each pathogen or tick, primers and probes were specifically designed for this study, except for Crimean-Congo Hemorrhagic fever virus for which primers and probe were obtained for a publication [24]. Each primer or probe set was validated on dilution range of several RNA positive controls (Table 1) and real-time TaqMan RT-PCRs on a LightCycler® 480 (LC480) (Roche Applied Science, Germany). Real-time RT-PCR assays were performed in a final volume of 20  $\mu$ l using the LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes Mix 2.7X (Roche Applied Science, Germany), with primers and probes at 500nM and 250 nM respectively and 2  $\mu$ l of control RNA. Thermal cycling conditions were as follows: RT at 63°C for 3 min, denaturation step at 95°C for 30s, 45 cycles at 95°C for 10s, 60°C for 30s and 72°C for 1sec and one final cooling cycle at 40°C for 30s. Nairobi Sheep Disease virus was targeted by real-time RT-PCRs with two different set of primers and probe to improve detection. For positive controls issued from a plasmid, primers and probes were tested by real-time TaqMan PCRs on a LightCycler® 480 (LC480) (Roche Applied Science, Germany).

Real-time PCR assays were performed in a final volume of 12  $\mu$ L using the LightCycler® 480 Probe Master Mix 1X (Roche Applied Science, Germany), with primers and probes at 200 nM and 2  $\mu$ L of control DNA. Thermal cycling conditions were as follows: 95°C for 5 min, 45 cycles at 95°C for 10s and 60°C for 15s and one final cooling cycle at 40°C for 10s.

#### **2.4. RT and cDNA pre-amplification**

RNAs were transformed on cDNA by RT following the instructions of the qScript cDNA Supermix kit (Quanta Biosciences, Beverly, USA). Briefly the reaction was performed in a final volume of 5  $\mu$ L containing 1  $\mu$ L of qScript cDNA supermix 5X, 1  $\mu$ L of RNA and 3  $\mu$ L of RNase free water. With one cycle at 25°C for 5 min, one cycle at 42°C for 30 min and one final cycle at 85°C for 5 min.

For DNA pre-amplification, the Perfecta Preamp Supermix (Quanta Biosciences, Beverly, USA) was used according to the manufacturer's instructions. Primers (targeted all viruses and tick) were pooled combining equal volume of primers (200 nM final each). The reaction was performed in a final volume of 5  $\mu$ L containing 1  $\mu$ L Perfecta Preamp 5X, 1.25  $\mu$ L pooled primers mix, 1.5  $\mu$ L Distilled water and 1.25  $\mu$ L cDNA, with one cycle at 95°C for 2 min, 14 cycles at 95°C for 10 sec and 3 min at 60°C. At the end of the cycling program the reactions were diluted 1:5. Pre-amplified cDNAs were stored at -20°C until needed.

#### **2.5. High-throughput real-time PCR system**

The BioMark™ real-time PCR system (Fluidigm, USA) was used for high-throughput microfluidic real-time PCR amplification using the 48.48 dynamic arrays (Fluidigm). These chips dispense 48 PCR mixes and 48 samples into individual wells, after which on-chip microfluidics assemble PCR reactions in individual chambers prior to thermal cycling resulting in 2,304 individual reactions.

Amplifications were performed using 6-carboxyfluorescein (FAM)- and black hole quencher (BHQ1)-labeled TaqMan probes with TaqMan Gene expression master mix in accordance with manufacturer's instructions (Applied Biosystems, France). A 6  $\mu$ L sample mix was prepared per sample, containing 3  $\mu$ L TaqMan® Gene expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.3  $\mu$ L sample Loading Reagent (Fluidigm PN 85000746) and 2.7  $\mu$ L of diluted pre-amplified cDNA. A TaqMan® primer assay was prepared for each target, containing 18  $\mu$ M of each primer and 4  $\mu$ M of probe. Three microliters of these primer assays were mixed with equal volumes of Dynamic Array (DA) assay loading reagent (Fluidigm PN 85000736) to make assay mixes (9  $\mu$ M primers and 2  $\mu$ M probe). Prior to

loading the samples and assay mixes into the inlets, the chip was primed in the IFC Controller MX apparatus. Five  $\mu\text{L}$  of sample mixes, prepared as described, were then loaded into each sample inlet of the dynamic array chip and 5  $\mu\text{L}$  of assay mixes were loaded into assay inlets. The chip was then placed on the IFC Controller MX for loading and mixing. After approximately 45 minutes the chip was ready for thermal cycling and detection of the reaction products on the Biomark. PCR cycling comprised of 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 2-step amplification of 15 s at 95°C, and 1 min at 60°C. Data were acquired on the BioMark™ Real-Time PCR System and analyzed using the Fluidigm Real-time PCR Analysis software to obtain crossing point (CP) values.

For primers and probe evaluation regarding their specificity for RNA reference materials, the assays were run in quadruplicate or duplicate. For microfluidic tool evaluation on field samples, the assays were performed in duplicate. One negative water controls were included per chip. *I. ricinus* RNA served to confirm the tested tick species and as a RNA extraction control. To determine if factors present in the sample could inhibit the PCR, *Escherichia coli* strain EDL933 DNA was added to each sample as an internal inhibition control. Primers and probe specific for the *E. coli eae* gene [25] were used for an internal control.

## 2.6. Validation of the results by RT-PCR, Nested PCR and sequencing

Conventional RT-PCR followed by Nested PCR using primers targeting different genes or regions than those of the BioMark™ system (Table 2), were used to confirm the presence of viral RNA in the field samples. Amplicons were sequenced by Eurofins MWG Operon (Germany), and then assembled using BioEdit software (Ibis Biosciences, Carlsbad). An online BLAST (National Center for Biotechnology Information) was used to compare results with published sequences listed in GenBank sequence databases.

## 2.7. Eyach virus detection in *I. ricinus* ticks from the Netherlands

RNA samples extracted from the 434 pools were screened for Eyach virus (EYAV) by rRT-PCR targeting the VP2 of the EYAV genome with specific primers and probes (Table 1). rRT-PCR Taqman assays were performed in a final volume of 20  $\mu\text{L}$  using the LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes master mix (Roche Applied Science, Germany) at 1 X final concentration, with 0.5  $\mu\text{M}$  specific primers and 0.25  $\mu\text{M}$  probes, 3.25 mM manganese acetate  $[\text{Mn}(\text{OAc})_2]$  and 2  $\mu\text{L}$  RNA. Positive and negative (water) controls were included in each run. rRT-PCR thermal cycling conditions were as follows: 63°C for 3 min, 95°C for 30 s, 45 cycles at 95°C for 10 s then 60°C for 30 s, followed by cooling at 40°C for 10 s.

Positive samples were used for one-step RT-PCR and nested PCR targeting the VP12 (Table 2). Positive RNA samples were reverse transcribed using Titan One Tube RT-PCR Systems (Roche Applied Science, Germany) in a 50 µl reaction volume containing 10 µl tick RNA, 10 µl 5 X RT-PCR buffer, 200 µM of each dNTP, 0.4 µM of each primer, 1 µl enzyme mix and 500 µM dithiothreitol (DTT). Thermal cycling conditions were 50°C for 30 min, 95°C for 3 min followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 min, with a final step at 72°C for 10 min. Nested PCR was performed using the Thermo Scientific Phusion High-Fidelity PCR Kit (Thermo Scientific, USA). PCRs were carried out in 50 µl reaction volume containing 5 µl tick cDNA, 10 µl 5 X PCR buffer, 200 µM of each dNTP, 0.5 µM of each internal primer, and 1 U Phusion DNA polymerase. Thermal conditions were 98°C for 30s, followed by 40 cycles at 98°C for 10 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and a final elongation at 72°C for 10 min.

## 2.8. Prevalence estimation

Prevalences were estimated assuming perfect sensitivity and specificity of pathogen detection using the online statistical program “Pooled prevalence for fixed pool size and perfect test” Method 2 (AusVet Animal Health Service <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=home>). Point estimates were based on the maximum likelihood method developed by Kline *et al* [26]. Exact 95% confidence intervals were obtained by assuming binomial distribution for the number of positive pools [27]. If all pools were positive, prevalence was recorded as > 14.3%, as the highest prevalence that can be distinguished from 100% when testing 45 pools of 33 ticks. If all pools were negative, prevalence was recorded as < 0.25%, since the 95% probability of sampling n negative ticks from a population with prevalence p is given as  $(1-p)^n$ .

## 3. Results

Primers and probes were specially designed to detect 22 tick-borne viruses (TBV) and two tick species (Table 1). Among them, only one design, able to detect Crimean-Congo Hemorrhagic fever virus (CCHFV), was issued from a publication [24] and not modified before use; the others were newly generated. Each set of primers and probes specifically identified their corresponding positive control samples (viral RNA or Plasmid with the sequence of interest) via Taqman RT-real-time PCRs or Taqman –real time PCRs on a LightCycler 480 apparatus, except two designs for Nairobi Sheep Disease virus (NSDV)

enable to detect their positive control. Resulting CP values varied from 8 to 40 depending on sample type. To avoid problem of sensitivity a step of cDNA pre-amplification was added, which enabled detection of all positive controls except NSDV again. Subsequently, after a RT step with random primers, all tick cDNA samples were pre-amplified prior to pathogen detection on the BioMark™ system. The specificity of each primer set was then evaluated using 36 TBVs positive controls (different strain of each virus when possible or plasmid) (Figure 2). Results demonstrated high specificity for each primers/probe set after pre-amplification (Figure 2). Indeed, 20 assays were only positive for corresponding positive controls. One assay for Powassan virus showed cross-reactivity with Deer tick virus. Two assays developed for the screening of the Nairobi Sheep Disease virus were not able to detect the RNA positive control.

A total of 19,305 nymphs, in 45 pools of 33 nymphs, from 13 european sites (five countries) were testing using the BioMark™ system. Among the targeted viruses, 18 (Tick-borne encephalitis (TBE) eastern subtype, TBE Siberian subtype, Langat, Louping ill, Deer tick, Powassan, Meaban, West Nile, Kyasanur, Omsk, African swine fever, Thogoto, Dhori, Kemerovo, Colorado tick fever virus, Dugbe, NSDV, Schmallenberg) were not detected in any country. The number of positive pools for each pathogen is presented in Table 3 and the prevalence was estimated at each site of collection (Table 4).

## **1/ TBEV**

TBE virus was detected in four pools from Sweden in RH/HR site with a prevalence of 0.28%. The four sequences obtained presented 100% identity, one sequence was deposited in GenBank (accession number: XX) and showed 98% homology with reference sequences from European subtype strains isolated in ticks (Italy, GenBank FJ159003), rodent (Finland, GenBank GU183380) and human sera (Czech Republic, GenBank KJ922515) (Table 5). The sequence presented only 96% homology with TBEV sequence isolated from *I. ricinus* ticks collected in Torö and Saringe areas, Sweden, in 2003 and 2009 respectively (GenBank DQ401140 and KF991106).

## **2/ Uukuniemi**

Uukuniemi virus (UUKV) was detected in five pools in Sweden with a prevalence of 0.21% for RH/HR site and 0.07% for MH and RV sites. The virus was also detected in two pools in the Netherlands (site K) with a prevalence of 0.14%. In total UUKV was detected in seven pools from Europe. Sequences obtained for the S and L segments (accession numbers:

XXX-XXX and XXX-XXX for S and L segment respectively) presented 99% and 97% homology with Uukuniemi S segment (GenBank M33551) and Uukuniemi L segment (GenBank D10759) respectively.

### 3/ Eyach

Eyach virus (EYAV) was detected in five pools from the Netherlands in K site with a prevalence of 0.36%. To confirm the presence of the virus in the Netherlands, 291 adult and 1167 nymphal ticks were collected from five locations in the province of Overijssel. Among the 434 pools, only one nymphal pool was positive for EYAV. Sequence obtained from site K and Overijssel province were 100% identical (accession number: XXX) and presented 95 % homology with a Eyach virus - VP12 sequence available in GenBank (AF343061).

### 4/ Nairovirus – CCHF-like

One pool of ticks collected in S site in France and two pools collected in D site in the Netherlands were found positives for CCHF virus with the Microfluidics system with a prevalence of 0.07% and 0.14% respectively. A nested PCR targeted the N gene of CCHF virus was tempted on positives samples but failed to amplify a sequence of interest. Then a nested PCR targeted the S segment of viruses from the Nairovirus genus was tested on the three samples. An amplification was obtained for one positive sample from D site (the Netherlands) when cDNAs issued from RT-PCR were diluted at 1 to 5 before being used in the nested PCR and a band of 400 bp was visualized on an agarose gel for this sample (Figure 3). The PCR product was send for sequencing but no interpretable sequence was obtained.

## 4. Discussion

In this study, we developed a new high-throughput method based on microfluidic PCRs with multiple primers/probe sets able to detect a high number of TBVs in a high number of ticks. Indeed a large scale epidemiological survey was performed to screen the presence of 22 main TBVs in 19,305 nymphs of *I. ricinus* collected in 13 European sites (one in UK, and three in France, Denmark, Sweden and the Netherlands). This extent investigation has (i) evaluated the prevalence of four viruses present in the collected ticks, (ii) allowed the detection of Uukuniemi virus for the first time in Sweden and Uukuniemi and Eaych viruses for the first time in the Netherlands, and (iii) detected a Nairovirus-CCHF-like virus in ticks from France and the Netherlands.

To allow a higher specificity and sensitivity of our primers/probe sets regarding their virus targeted, we added an initial step of preamplification. The need of this specific step has already been demonstrated for the detection of 37 tick-borne pathogens (bacteria and parasites) with the same system and allowed to specifically amplify targeted pathogen sequences [23]. Despite this preamplification step, two designs targeted the Nairobi Sheep Disease virus were enabled to detect their RNA positive control. This RNA sample wasn't also amplified with primers targeted virus from the Nairovirus genus leading us to suppose the degradation of this RNA sample. Unfortunately we were not able to obtain another positive control for this virus. Confirmation of the sensitivity of these primers/probes sets need to be done in the future at least using a plasmid with the sequence of interest. Among the others sets of primers/probe, 13 have allowed the detection of their targeted viral RNA. For eight viruses, RNA positive controls were not available and plasmids containing target sequences have been used. For those viruses, and associated primers/probe sets, further evaluation of specificity is required. Detection limits and sensitivity have not been experimentally determined, because our tool was developed for epidemiologic rather than diagnostic purposes. Moreover, these experiments are somewhat difficult to implement and require a gold standard for each pathogen and consistent positive controls, which are not available for all TBVs.

In our study we screened 19,305 *I. ricinus* nymphs collected in 13 European sites (one in UK, three in France, Denmark, Sweden, and The Netherlands) for the presence of 22 TBVs. Among them 18 were not detected, and four viruses' prevalence were estimated.

TBEV was only detected in one site in Sweden with a prevalence of 0.28%. TBEV causes severe central nervous system infection in 15,000 people in Europe and Asia each year [28]. Three subtypes of this virus exist: European (vectored by *I. ricinus*), Siberian and Far Eastern (vectored by *I. persulcatus*); which present a geographical distribution globally linked to their name [6, 12, 29]. The particularity of TBEV distribution inside each country is his focal pattern, each focus representing a hotspot of virus circulation [30, 31]. TBE is endemic in central and southern Sweden, with the highest number of TBEV foci present in the Stockholm archipelago [32]. TBEV prevalence estimated in our study is closed to the one estimated in northern Europe (Denmark, Norway, Sweden and Finland). Indeed, Petterson *et al*, in 2014, evaluated the minimal infection rate (MIR) for TBEV in nymphal and adult *I. ricinus* at 0.28% and 0.23% for southern Sweden, with infection prevalence significantly lower in nymphs (0.10%) than in adult ticks (0.55%). They also estimated at well-known TBEV-endemic locality, Torö island south-east of Stockholm, the TBEV prevalence (MIR) at



0.51% in nymphs and 4.48% in adults of *I. ricinus* [32]. Sequences of TBEV isolated in our study presented 98% and 96% homology with sequences of virus isolated in *I. ricinus* in Europe and Sweden, Torö 2003 and Saringe 2009 areas, respectively [33].

Surprisingly no TBEV or Louping ill virus infected ticks have been detected in our study in France, Denmark, UK, and the Netherlands even if TBE and Louping ill viruses are known to circulate in those countries [31, 34-39]. Nevertheless the prevalence of these viruses in ticks is usually low, and virus detection occurs mainly in local foci where the virus is known to circulate.

UUKV was detected in five pools from the three sites in Sweden with a prevalence comprised between 0.07% and 0.21%. The virus was also detected in two pools in the Netherlands, in K site, with a prevalence of 0.14%. Sequences obtained for the S and L segments presented 99% and 97% homology with Uukuniemi S segment and L segment sequences available in GenBank (GenBank M33551 and D10759 respectively). UUKV was originally isolated at Uukuniemi (southern Finland) in 1979 from *I. ricinus* collected from cattle [40]. This virus is maintained in nature between his tick vector, *I. ricinus*, and is vertebrate hosts, forest rodents and birds [41]. No animal or human disease due to this virus has been reported until now [41]. This virus is known to circulate in northern Europe (Norway and Finland), and eastern Europe (Russia, Estonia, Lithuania, etc.) [41]. Nevertheless, our study is the first report of UUKV in ticks in Sweden and in the Netherlands, even if the virus is known to be present in neighbor countries. Birds and migratory birds could have played a role in the dispersion of the virus, indeed several strains of UUKV have been isolated from immature *I. ricinus* collected on migratory passerines [42].

EYAV was detected in five pools in one site from the Netherlands with a prevalence of 0.36%. The presence of this virus in the Netherlands was confirmed by screening 291 adult and 1167 nymphal ticks collected from five locations in the province of Overijssel. Finally, one nymphal pool was positive for EYAV. Sequences obtained presented 95 % homology with Eyach virus sequence (VP12 sequence, GenBank AF343061). EYAV was first isolated from *I. ricinus* ticks in Germany in 1972, following by isolations in two tick species in France in 1981, *I. ventalloi* and *I. ricinus* [43, 44]. After 30 years of memory lapse, the virus was detected in two regions from France in 2010 and 2012 in *I. ricinus* ticks with a prevalence comprised between 0.07% and 5.26% [45]. Until now, no viral RNA has been isolated from animals or humans, even if anti-Eyach virus antibodies have been identified in many animal species in France (European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), rodents, sheep, deer and mountain goats) [46, 47]. Moreover, EYAV was indirectly incriminated in cases of

encephalitis and polyradiculoneuritis in the former Czechoslovakia [48], and Moutailler *et al.* demonstrated the ability of EYAV to reach brain of new suckling mice after intraperitoneal inoculation, indicated the ability of the virus to multiply in vertebrate hosts [45]. Thus, detection of this specific virus in patient presenting encephalitis could lead to a better evaluation of his prevalence in humans in Europe.

CCHF-like virus was detected in one pool from France (S site) and two pools from the Netherlands (D site) with a prevalence of 0.07% and 0.14% respectively. A Nested PCR specific to CCHF virus felt to confirm our result but a Nested PCR specific to *Nairovirus* genus gave one band at the expected size and was sent for sequencing. Unfortunately, no sequence was obtained to confirm our findings. The primers/probes set use in our microfluidic system is the only design that have been taken from the literature without any modification and is used by laboratory to detect CCHFV in patients [24]. However, our result suggest an ability of those primers/probes sets to detect also, in ticks, other viruses from the *Nairovirus* genus, closely related to CCHFV, that should be named CCHF-like viruses. CCHFV is a hemorrhagic virus with high public health concern in Europe, because of his emergence in numerous eastern and southern European countries last decades, and recent fatal autochthonous human cases in Spain [11, 49, 50]. Nevertheless, new *Nairovirus* sequences have been detected in ticks in different studies, demonstrating the risk of misidentification of CCHFV presence in European ticks [45, 51-53]. To conclude, CCHFV prevalence studies in ticks should always confirm their findings by sequencing to avoid misinterpretation, as Orkun and collaborators did in a large scale survey perform on different tick species collected from different areas in Turkey [54]. Consequently to our findings, a new primers/probes set for CCHFV will be implemented in the tool.

Without astonishment, 18 TBVs were not detected in any country. Nevertheless only one of them is known to be transmitted by *I. ricinus*, Kemerovo virus, but his geographical distribution is focused in Eastern part of Europe [41].

This study demonstrates the importance of high-throughput technics to allow the detection of numerous TBVs in ticks, often less studied than other TBPs as bacteria and parasites. Other high-throughput technics (metagenomics methods) exist as Next Generation Sequencing (NGS, RNA sequencing) [45] or resequencing array, but they are often time consuming (weeks to months), and require specialized bioinformatics tools (computer, server, specialized software). Moreover, those technics present some weakness as the lack of TBV prevalence estimation. Metagenomics microarray technology has also been developed to allow rapid simultaneous identification of all known virus but also all virus families (within

hours) in clinical samples [55-57]. This technic should be tested on tick samples to demonstrate its ability to be use in epidemiological survey. Nevertheless, the main advantage of our microfluidic system is its ability to be easily implemented with new sets of primers/probes targeted newly emergent viruses, compared to arrays with fixed panels of probes. As an example, the emergence of Heartland and Bourbon viruses in USA [13, 58], and Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) in Asia [16, 17], since the development of our new tool, has lead us to develop primers/probe sets specific to those viruses and now currently use in novel large scale epidemiological surveys of TBVs in ticks.

In conclusion, our study demonstrates the power of this new screening approach based on microfluidic real-time PCRs that allows the detection of numerous TBVs in numerous tick, and host samples. This tool represents a powerful and rapid system for TBVs surveillance in Europe and could be easily customized to fit viral emergence.

## **5. Acknowledgments**

This project was funded by CoVetLab grant (ANSES, SVA, CVI, DTU, APHA), ANIHWA Grant Arbonet, and by Animal Health Department grant from INRA. This project was done under the framework of EurNegVec COST Action TD1303. We thank the “Tiques et Maladies à Tiques (TMT)” group of the “Réseau Ecologie des Interactions Durables”CNRS for stimulating discussion and support. We also thank all the colleagues who provided RNA positive controls: Dr. Marie-Frédérique LE POTIER (ANSES, France), Dr. Olga Kosoy, Dr. Michael Kosoy, Dr. Robert Lanciotti, Dr. Amy Lambert, Dr. Lynn Osikowicz and Dr. Brandy Russell (CDC, Fort Collins, USA), Dr. Sylvie Lecollinet (ANSES, France), Dr. Alain Dupuis and Dr. Laura Kramer (Wadsworth center, New York State department of Health, USA), Dr. Michael Baron (The Pirbright Institute, UK), Dr. Bernd Hoffmann (FLI, Germany), Dr. Rémi Charrel (Unite des Virus Emergents, Faculte de Medecine de Marseille, France), Dr. Olivier Ferraris and Dr. Christophe Peyrefitte (Institut de Recherche Biomédicale des Armées, France) and Dr. Karen Mansfield (APHA, UK).

## **6. Author contributions**

MG, LM and SM wrote the paper. MG, LM, NA, ED did the experiment. AA, JC, FJvdW, SJ, HS, KLM, KK, RB collected ticks and extracted RNAs. MG, LM, AN, ED, SD, PF, AA, JC, BH, FJvdW, SJ, HS, KLM, KK, RB, and SM reviewed the manuscript. SM supervised the manuscript.

**Table 1. List of tick-borne viruses, tick species, targets, primers/probe sets, and positive controls.**

<sup>a</sup> Plasmids are recombinant pBluescript IISK+ containing the target gene. # Primers and Probe from Wolfel, 2007 Emerg inf dis.

Family	Genus	Species	Target	Name	Sequence	Length (bp)	Positive control
<b>Asfarviridae</b>	Asfivirus	African swine fever virus	Vp72	ASFV_F	CGATGATGATTACCTTTGCTTTG	84	Culture of ASFV Georgia strain
				ASFV_R	AAAATTCTCTTGCTCTGGATACG		
				ASFV_P	AAGCCACGGGAGGAATACCAACCCAG		
<b>Orthomyxoviridae</b>	Thogotovirus	Thogoto virus	Segment 6	Thogoto_F	GGTCCTCAAGAACGTCAGCA	113	Plasmid <sup>a</sup>
				Thogoto_R	CATGTAAGTACCAAGACTCATCG		
				Thogoto_P	AAAGTCGCCCTTCTCCGGGAAAGCAT		
		Dhori virus	Segment 2	Dhori_F	CAAGCTCTGGTGTGCCTGT	81	Plasmid <sup>a</sup>
				Dhori_R	CAGTTACTTCTGAGACAGCCT		
				Dhori_P	AGGAGGGGAAGAGAAGTTGGCCAAG		
<b>Reoviridae</b>	Orbivirus	Kemerovo virus	Segment 2	Kemerovo_F	GTCAGACGGATTTTCGACCTC	71	Plasmid <sup>a</sup>
				Kemerovo_R	GCGAGCCAGATCCCGATGT		
				Kemerovo_P	ACGGGCCAACACTCGTTCATCACAG		
	Coltivirus	Colorado tick fever virus	Vp2	Colorado_F	TTCTTGCTTCTTCCCGGATCA	80	Culture of Florio VR-1233 strain
				Colorado_R	CGATTCGGTTTCCGGTAACAT		
				Colorado_P	CATGACCATATCCACGGGAAGCTATCA		
		Eyach virus	Vp2	Eyach_F	TGGCTGACAACATGACGGATA	98	New borne mice brain
				Eyach_R	GGCCTCACGATACTTTCGATT		
				Eyach_P	ACGGGCTCGGTACTTCGGTTGAGAT		
<b>Bunyaviridae</b>	Nairovirus	Crimean-Congo Hemorrhagic fever virus (CCHF)	Segment S	CCHF_F#	CAAGGGGTACCAAGAAAATGAAGAAGGC	181	Plasmid <sup>a</sup>
				CCHF_R#	GCCACAGGGATTGTTCCAAAGCAGAC		
				CCHF_P1#	TGTCAACACAGCAGGGTGCATGTAGAT		
				CCHF_P2#	TGTAAGCACGGCAGGGTGCATGTAAAT		
				CCHF_P3#	ACTCCAATGAAGTGGGGGAAGAAGCT		
		Dugbe virus	Segment S	Dugbe_F	GCACAAGGAGCACAAATAGAC	134	Culture of Dugbe virus
				Dugbe_R	TTTTTGCCCTCCTCTAGCACTC		
				Dugbe_P	TGGCCCATCTCAAAGAGGAATTGAGAC		
		Nairobi sheep disease virus	G1	NSDV_G1_F	TCTAAGTGCTAGCCCTGATGT	112	Culture of NSDV
				NSDV_G1_R	GCCAACTGAGTGTTCTTCTTC		

Family	Genus	Species	Target	Name	Sequence	Length (bp)	Positive control
		(NSDV)	G1	NSDV_G1_P	TTCTACAGGCCGTCCTCAAGGAAGA	112	Culture of NSDV
				NSDV_G1bis_F	ACTAAGTGCAAGCTCAGAAGC		
				NSDV_G1bis_R	ACCCACAGAATGTTTCATCCTC		
				NSDV_G1bis_P	TCCTACTGTGTGTCCTTCAGGGGTTG		
	Phlebovirus	Uukuniemi virus	Segment L	Uuku_F	GTGGCAGCTTTTCTCTGGTTT	82	Culture of TC259 strain
				Uuku_R	GGGGAAACTGTCATGCCTAAT		
				Uuku_P	CCTTTTGCCAGTTTGGTCAGTTGCTCC		
	Orthobunyaviruses	Schmallenberg	Segment S	SBV_F	CGTTGGATTGCTGATACATGC	102	Culture of SBV 1568 V3 strain
				SBV_R	GGCCCAGGTGCATCCCTT		
				SBV_P	AACCTCAGCAAGGGGCATGACAATCTG		
Flaviviridae	Flavivirus	Tick-borne encephalitis virus European subtype (TBE)	E gene	TBE_Euro_F	TCCTTGAGCTTGACAAGACAG	91	Culture of Absettarov, Hypr, Neudoerfl, Salem strains
				TBE_Euro_R	TGTTTCCATGGCAGAGCCAG		
				TBE_Euro_P	TGGAACACCTTCCAACGGCTTGGCA		
		Tick-borne encephalitis virus Far-Eastern subtype (TBE)	E gene	TBE_FarEast_F	TCAGAACACCTACCGACGG	121	Plasmid <sup>a</sup>
				TBE_FarEast_R	CTCCAAACTCAACCAGCCGT		
				TBE_FarEast_P	CTGGCAGGTCCACCGGGACTGGT		
		Tick-borne encephalitis virus Siberian subtype (TBE)	E gene	TBE_Sibe_F	TTGTTGTGCAGAGTCGCCAG	82	Plasmid <sup>a</sup>
				TBE_Sibe_R	TCGGAAGGTGTTCCAGAGTC		
				TBE_Sibe_P	TGGCGTTGACTTGGCTCAGACTGTCA		
		Louping ill virus	E gene	Louping_F	GCTGTCAAGATGGATGTGTACAA	113	Culture of 369T2 strain
				Louping_R	CCACTCTTCAGGTGATACTTGT		
				Louping_P	CTTGGAGATCAGACTGGAGTGCTGCT		
		Langat virus	E gene	Langat_F	ATACCATAAAGGTGGAGCCAC	84	Culture of TP21 strain
				Langat_R	CTGTGAACGAGGCTGACTTC		
				Langat_P	ACACTGGAGAGTTTGTGGCAGCCAATG		
		Deer tick virus	Polypeptide	Deertick_F	GACAGCTTAGGAGAACAAAGAG	94	Culture of

Family	Genus	Species	Target	Name	Sequence	Length (bp)	Positive control
			n	Deertick_R	CGGTCACCTTTTCAGCTTTCGC		CT390, FDRSP-08, JHSP-08 strains
				Deertick_P	CTGGGAGTGGTCATGGTGACTACTTC		
		Powassan virus	Polyprotei n	Powassan_F	TGGGGATTCTTTGGCACGC	75	Culture of LB, 64-7062 strains
				Powassan_R	GTGGTACCGTTTTCCAGAACA		
				Powassan_P	TTTTCAGCACTGGGGGTCTGGCCGT		
		West Nile virus (WN)	Polyprotei n	WN_F	CAGCGATCTCTCCACCAAAG	69	Culture of IS98, Kunjin, MP22 strains
				WN_R	GGGTCAGCACGTTTGTCAATTG		
				WN_P	TGGCTTCTCCCATGGTCGGGCAC		
		Meaban virus	NS5	Meaban_F	TGAGAAGAGCGGTGGAGGA	87	Culture of Meaban virus
				Meaban_R	TTTCCTCCCTCAAGCTCGG		
				Meaban_P	CCAAGTCTTTCACGAGCCATCCGAG		
		Omsk Hemorrhagic fever virus	Polyprotei n	Omsk_F	AATGGGAGCATTTCAGCTGGC	87	Plasmid <sup>a</sup>
				Omsk_R	GTCCGTCCTTCATCACCAAC		
				Omsk_P	TCATGGAAATGGTGCGAGCAGAAGGG		
		Kyasanur forest disease virus	Polyprotei n	Kyasanur_F	ACACGATGCACACACCTGC	72	Plasmid <sup>a</sup>
				Kyasanur_R	CACCAATGAAACTCTAGTCGTC		
				Kyasanur_P	AGAACCGGGACTTTGTCTCAGGGAC		
Vecteur		<i>Ixodes ricinus</i>	CO1	Ix_ri_CO1_F	TGGGGCAGGAACTGGATGAA	180	Tick
				Ix_ri_CO1_R	CGTTCTAAAGATAGTCCTGGTG		
				Ix_ri_CO1_P	CAGTATACCCCCCACTTTCAGCAAATATTTC		
		<i>Ixodes persulcatus</i>	CO1	Ix_per_CO1_F	CAGGGACAGGATGAACTGTTTA	166	Tick
				Ix_per_CO1_R	GATATTCCAGGGGAACGTATG		
				Ix_per_CO1_P	TCCTCCTCTATCATCTAACATCTCCCATTCA		

**Table 2. Primers used to confirm the presence of viral RNA in ticks.**

Species	Targeted gene	Primer name	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)	References
<b>Tick-borne encephalitis virus European subtype</b>	NS5 (RT-PCR)	FSM-1	GAG GCT GAA CAA CTG CAC GA	357	[59]
		FSM-2	GAA CAC GTC CAT TCC TGA TCT		
	NS5 (Nested PCR)	FSM-1i	ACG GAA CGT GAC AAG GCT AG	252	
		FSM-2i	GCT TGT TAC CAT CTT TGG AG		
<b>Uukuniemi virus</b>	L segment (RT-PCR)	SegL_UukuV_i1+	ATG GAA GGG TTT GTC AGT CCC CC	559	[60]
		SegL_UukuV_1-	AAG TTG CTG GAA GCC TTC AGA GTT GC		
	L segment (Nested PCR)	SegL_UukuV_2+	ATT CCA AAA CCC CAG AAG ATG	244	[60]
		SegL_UukuV_2-	TCC TCT TTG TTC TTA AGG TAA CC		
	S Segment (RT-PCR)	SegS_UukuV_1+	ACA CAA AGA CCT CCA ACT TAG CTA TCG	1720	
		SegS_uukuV_1-	ACA CAA AGA CCC TCC		
	S Segment (Nested PCR)	SegS-UukuV_2+	ATG GCT ATG CCG GAG AAT TGG GTG CGC	764	
		SegS_UukuV_2-	TCAGATCAATGATCTGAGGACAGTTGCAGCC		
<b>Eyach virus</b>	12 Segment (RT-PCR)	COL-12S	GAT GCC CTG CAA CCG CGC TG	656	[46]
		COL-12R	GAC TGC AAT TAC CCG TCC CGG		
		Eyach-12Si	TAC TGC CTC TGC TTT TTT GAA	527	New design
		Eyach-12Ri	CGT CCC GGA AGA ATG ATG CTA		
<b>CCHF virus</b>	N (RT-PCR)	CCHF/F2	TGG ACA CCT TCA CAA ACT	536	[61]
		CCHF/R3	GAC AAA TTC CCT GCA CCA		
	N (Nested PCR)	CCHF/F3	GAA TGT GCA TGG GTT AGC TC	260	
		CCHF/R2	GAC ATC ACA ATT TCA CCA GG		
<b>Nairovirus genus</b>	Segment S (RT + preamplification + PCR)	PanNairo_S_F	TCT CAA AGA AAC ACG TGC CGC	400	[62]
		PanNairo_S_R	GTC CTT CCT CCA CTT GWG RGC AGC CTG CTG GTA		

**Table 3. Number of positive pools of ticks out of the 45 tested, for 3 sites in France, Denmark, Sweden, the Netherlands and one site in UK using the microfluidic tool (BioMark™ system).**

Virus	Number of positive pools (out of 45 tested)												
	France			Denmark			Sweden			The Netherlands			UK
	Site M	Site A	Site S	Site BIS	Site KAL	Site AAB	RH or HR	MH	RV	A	D	K	UK
ASFV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thogoto virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dhori virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kemerovo virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Colorado tick fever virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eyach virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
CCHF	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Dugbe virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NSDV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uukuniemi virus	0	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	2	0
Schmallenberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TBEV European subtype	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
TBEV Far-Eastern subtype	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TBEV Siberian subtype	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Louping ill virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Langat virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Deer tick virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



<b>Powassan virus</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>West Nile virus (WN)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Meaban virus</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Omsk Hemorrhagic fever virus</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Kyasanur forest disease virus</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**ASFV: African swine fever virus; TBEV: Tick-borne encephalitis virus; CCHFV: Crimean-Congo Hemorrhagic fever virus; NSDV: Nairobi sheep disease virus**

**Table 4. Estimated prevalence of pathogens detected in *Ixodes ricinus* in France, Denmark, Sweden, the Netherlands and UK.**

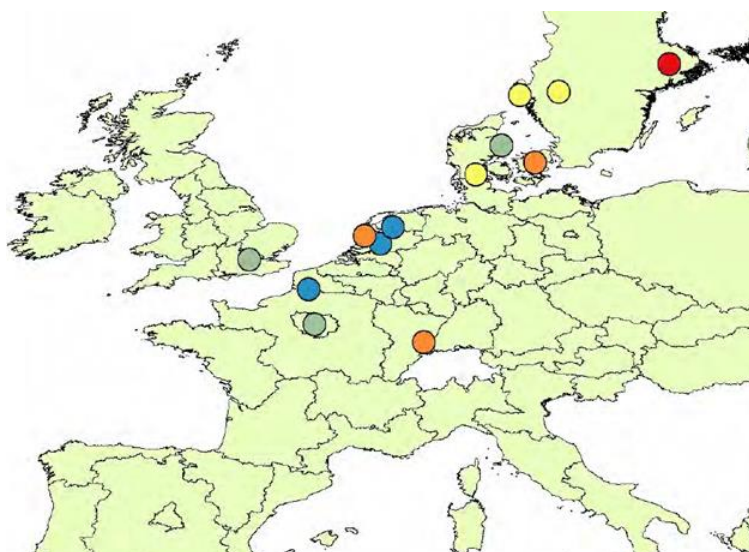
Estimated prevalence % (95% CI) [number of positive pools / 45 pools tested]													
	France			Denmark			Sweden	The Netherlands			UK		
	M	A	S	BIS	KAL	AAB	RH or HR?	MH	RV	A	D	K	UK
<b>TBEV European subtype</b>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	<b>0.28</b> (0.08-0.72) [4/45]	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>
<b>Uukuniemi virus</b>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	<b>0.21</b> (0.04-0.61) [3/45]	<b>0.07</b> (0.001-0.38) [1/45]	<b>0.07</b> (0.001-0.38) [1/45]	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	<b>0.14</b> (0.02-0.50) [2/45]	< 0.25 <sup>a</sup>
<b>Eyach virus</b>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	<b>0.36</b> (0.11-0.83) [5/45]	< 0.25 <sup>a</sup>
<b>CCHF</b>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	<b>0.07</b> (0.002-0.38) [1/45]	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>	<b>0.14</b> (0.02-0.50) [2/45]	< 0.25 <sup>a</sup>	< 0.25 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> All pools negative. Point estimates were based on the maximum likelihood method developed by Kline *et al.* (REF). If all pools were negative, prevalence was recorded as <0.25% since the 95% probability of sampling n negative ticks from a population with prevalence p is given as (1-p)<sup>n</sup>.

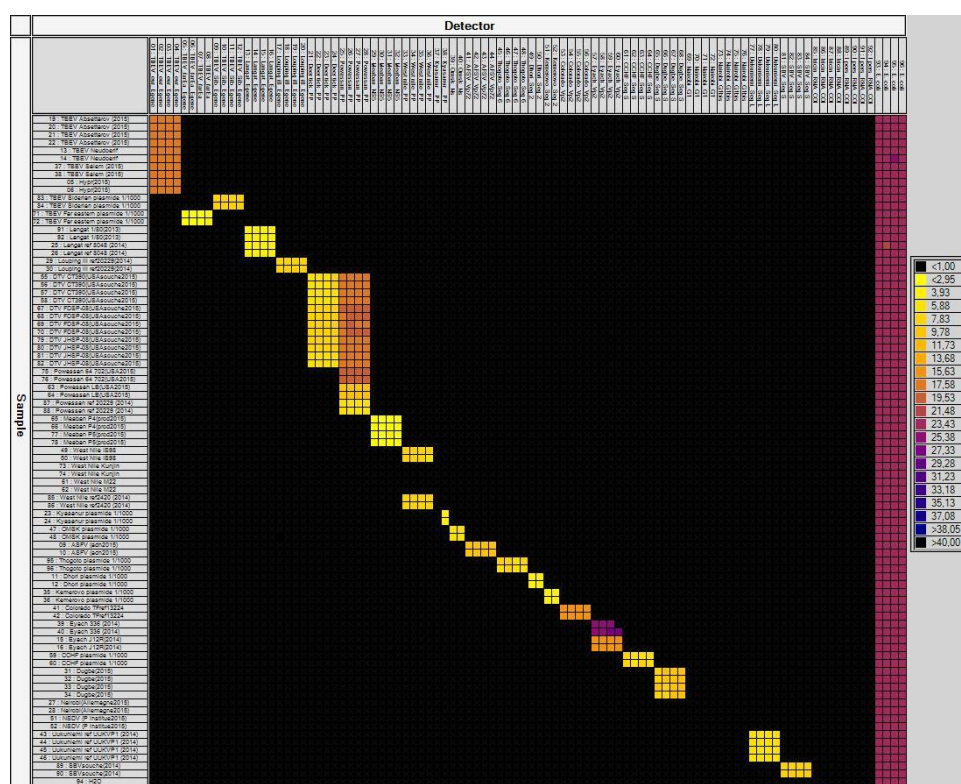
**Table 5. Homology between deposited sequences and reference sequences in GenBank.**

<b>Viral Species</b>	<b>Nb of samples tested</b>	<b>Nb of samples sent for sequencing</b>	<b>Nb of samples with an interpreted sequence</b>	<b>Deposited sequence</b>	<b>Length (bp)</b>	<b>Percentage of identity (%)</b>	<b>Reference sequence</b>
<b>TBEV European subtype</b>	4	4	4	XXXX Only one deposited because 100 % identity between the 4 sequences	252	98	Salem (FJ572210); KrM 93 (HM535611); Kumlinge (GU183380); Absettarov (KJ000002); Tobrman (KJ922515); FVG ML Raccolana (FJ159003)
<b>Uukuniemi virus</b>	7	6 for L segment 6 for S segment	5 for L segment 5 for S segment	XXX-XXX for L segment XXX-XXX for S segment	202-245 604-698	97 99	Uukuniemi virus L (D10759) Uukuniemi virus S (M33551)
<b>Eyach virus</b>	6	5	5	XXXX Only one deposited because 100 % identity between the 5 sequences	510	95	EYAV-Gr VP12 gene partial cds (AF343061)
<b>CCHF virus</b>	3	1	0	-	-	-	-

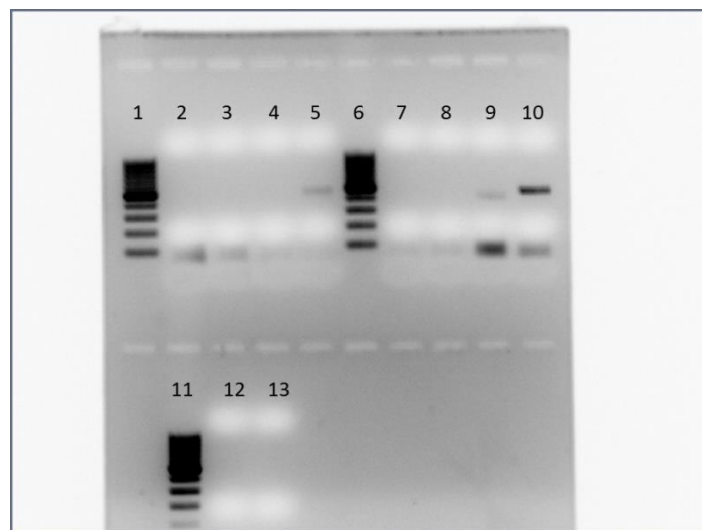
## Figure legends



**Figure 1.** Sampling areas of *Ixodes ricinus* in Europe. Three sites for France, Denmark, Sweden and the Netherlands and one site in UK.



**Figure 2.** BioMark™ dynamic array system specificity test (96.96 chip). Each square corresponds to a single real-time PCR reaction, where rows indicate the pathogen in the positive control and columns represent the targets of each primers/probe set. CP values for each reaction are indicated in color; the corresponding color scale is presented in the legend on the right. The darkest shade of blue and black squares are considered as negative reactions with CP > 30.



**Figure 3.** Visualization of Nested PCR products targeted the N gene of viruses from the Nairovirus genus on an agarose gel 2%. Line 1, 6 and 11: Ladder 100bp. 1/ Nested PCR was run with pure cDNA issued from RT-PCR. Line 5: Positive controls, RNA from Dugbe virus. Line 2: positive sample S36 (S site, France). Line 3: positive sample D22 (D site, the Netherlands). Line 4: positive sample D31 (D site, the Netherlands). Line 12: Negative control, water. 2/ Nested PCR was run with diluted cDNA (1/5 dilution) issued from RT-PCR. Line 10: Positive controls, RNA from Dugbe virus. Line 7: positive sample S36 (S site, France). Line 8: positive sample D22 (D site, the Netherlands). Line 9: positive sample D31 (D site, the Netherlands). Line 13: Negative control, water.

## References

1. Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, Sonenshine DE, Roe RM, Waterhouse RM, *et al.* Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nat Commun.* 2016;7:10507. doi: 10.1038/ncomms10507. PubMed PMID: 26856261; PubMed Central PMCID: PMC4748124.
2. Egyed L. Difference in susceptibility of small rodent host species to infestation by *Ixodes ricinus* larvae. *Exp Appl Acarol.* 2017;72(2):183-9. doi: 10.1007/s10493-017-0121-2. PubMed PMID: 28593480.
3. Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubalek Z, Foldvari G, *et al.* *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front Public Health.* 2014;2:251. doi: 10.3389/fpubh.2014.00251. PubMed PMID: 25520947; PubMed Central PMCID: PMC4248671.
4. Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* 2012;28(10):437-46. doi: 10.1016/j.pt.2012.07.003. PubMed PMID: 22902521.
5. de la Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci.* 2008;13:6938-46.
6. Nuttall PA. Tick-borne viruses. In: D.E. Sonenshine aRMR, editor. *Biology of ticks*. 2. New York, USA: Oxford University Press; 2014. p. 180-210.
7. Jore S, Vanwambeke SO, Viljugrein H, Isaksen K, Kristoffersen AB, Woldehiwet Z, *et al.* Climate and environmental change drives *Ixodes ricinus* geographical expansion at the northern range margin. *Parasit Vectors.* 2014;7:11. doi: 10.1186/1756-3305-7-11. PubMed PMID: 24401487; PubMed Central PMCID: PMC43895670.

8. Lindgren E, Andersson Y, Suk JE, Sudre B, Semenza JC. Public health. Monitoring EU emerging infectious disease risk due to climate change. *Science*. 2012;336(6080):418-9. doi: 10.1126/science.1215735. PubMed PMID: 22539705.
9. Vayssier-Taussat M, Cosson JF, Degeilh B, Eloit M, Fontanet A, Moutailler S, *et al.* How a multidisciplinary 'One Health' approach can combat the tick-borne pathogen threat in Europe. *Future Microbiol.* 2015;10(5):809-18. doi: 10.2217/fmb.15.15. PubMed PMID: 26000651.
10. Hinten SR, Beckett GA, Gensheimer KF, Pritchard E, Courtney TM, Sears SD, *et al.* Increased recognition of Powassan encephalitis in the United States, 1999-2005. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008;8(6):733-40. doi: 10.1089/vbz.2008.0022. PubMed PMID: 18959500.
11. Maltezou HC, Andonova L, Andraghetti R, Bouloy M, Ergonul O, Jongejan F, *et al.* Crimean-Congo hemorrhagic fever in Europe: current situation calls for preparedness. *Euro Surveill.* 2010;15(10):19504. PubMed PMID: 20403306.
12. Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 8):1781-94. doi: 10.1099/vir.0.011437-0. PubMed PMID: 19420159.
13. Kosoy OI, Lambert AJ, Hawkinson DJ, Pastula DM, Goldsmith CS, Hunt DC, *et al.* Novel thogotovirus associated with febrile illness and death, United States, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(5):760-4. doi: 10.3201/eid2105.150150. PubMed PMID: 25899080; PubMed Central PMCID: PMC412252.
14. McMullan LK, Frace M, Sammons SA, Shoemaker T, Balinandi S, Wamala JF, *et al.* Using next generation sequencing to identify yellow fever virus in Uganda. *Virology.* 2012;422(1):1-5. doi: 10.1016/j.virol.2011.08.024. PubMed PMID: 21962764.
15. Tokarz R, Sameroff S, Leon MS, Jain K, Lipkin WI. Genome characterization of Long Island tick rhabdovirus, a new virus identified in *Amblyomma americanum* ticks. *Virol J.* 2014;11:26. doi: 10.1186/1743-422X-11-26. PubMed PMID: 24517260; PubMed Central PMCID: PMC412252.
16. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YL, *et al.* Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med.* 2011;364(16):1523-32. doi: 10.1056/NEJMoa1010095. PubMed PMID: 21410387; PubMed Central PMCID: PMC3113718.
17. Yun SM, Lee WG, Ryou J, Yang SC, Park SW, Roh JY, *et al.* Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks collected from humans, South Korea, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(8):1358-61. doi: 10.3201/eid2008.131857. PubMed PMID: 25061851; PubMed Central PMCID: PMC4111194.
18. Laaksonen M, Sajanti E, Sormunen JJ, Penttinen R, Hanninen J, Ruohomaki K, *et al.* Crowdsourcing-based nationwide tick collection reveals the distribution of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* and associated pathogens in Finland. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(5):e31. doi: 10.1038/emi.2017.17. PubMed PMID: 28487561.
19. Raileanu C, Moutailler S, Pavel I, Porea D, Mihalca AD, Savuta G, *et al.* Borrelia Diversity and Co-infection with Other Tick Borne Pathogens in Ticks. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:36. doi: 10.3389/fcimb.2017.00036. PubMed PMID: 28261565; PubMed Central PMCID: PMC5306127.
20. Rar V, Livanova N, Tkachev S, Kaverina G, Tikunov A, Sabitova Y, *et al.* Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):258. doi: 10.1186/s13071-017-2186-5. PubMed PMID: 28545549; PubMed Central PMCID: PMC5445278.
21. Zajac V, Wojcik-Fatla A, Sawczyn A, Cisak E, Sroka J, Kloc A, *et al.* Prevalence of infections and co-infections with 6 pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2017;24(1):26-32. doi: 10.5604/12321966.1233893. PubMed PMID: 28378977.
22. Bichaud L, de Lamballerie X, Alkan C, Izri A, Gould EA, Charrel RN. Arthropods as a source of new RNA viruses. *Microb Pathog.* 2014;77:136-41. doi: 10.1016/j.micpath.2014.09.002. PubMed PMID: 25239874.
23. Michelet L, Delannoy S, Devillers E, Umhang G, Aspan A, Juremalm M, *et al.* High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:103. doi: 10.3389/fcimb.2014.00103. PubMed PMID: 25120960; PubMed Central PMCID: PMC4114295.

24. Wolfel R, Paweska JT, Petersen N, Grobbelaar AA, Leman PA, Hewson R, *et al.* Virus detection and monitoring of viral load in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus patients. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(7):1097-100. doi: 10.3201/eid1307.070068. PubMed PMID: 18214191; PubMed Central PMCID: PMCPMC2878241.
25. Nielsen EM, Andersen MT. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):2884-93. PubMed PMID: 12843017; PubMed Central PMCID: PMCPMC165313.
26. Kline RL, Brothers TA, Brookmeyer R, Zeger S, Quinn TC. Evaluation of human immunodeficiency virus seroprevalence in population surveys using pooled sera. *J Clin Microbiol.* 1989;27(7):1449-52. PubMed PMID: 2768435; PubMed Central PMCID: PMCPMC267591.
27. Cowling DW, Gardner IA, Johnson WO. Comparison of methods for estimation of individual-level prevalence based on pooled samples. *Prev Vet Med.* 1999;39(3):211-25. PubMed PMID: 10327439.
28. Dobler G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):221-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.024. PubMed PMID: 19765917.
29. Simmonds P, Becher P, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, *al. e.* Flaviviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* London: Elsevier Academic Press; 2012. p. 1003-20.
30. Dobler G, Hufert FT, Pfeffer M, Essbauer S. Tick-borne encephalitis: from microfocus to human disease. *Prog Parasitol.* 2011;2:323-31.
31. Suss J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011;2(1):2-15. doi: 10.1016/j.ttbdis.2010.10.007. PubMed PMID: 21771531.
32. Pettersson JH, Golovljova I, Vene S, Jaenson TG. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in northern Europe with particular reference to Southern Sweden. *Parasit Vectors.* 2014;7:102. doi: 10.1186/1756-3305-7-102. PubMed PMID: 24618209; PubMed Central PMCID: PMCPMC4007564.
33. Asghar N, Pettersson JH, Dinnetz P, Andreassen A, Johansson M. Deep sequencing analysis of tick-borne encephalitis virus from questing ticks at natural foci reveals similarities between quasispecies pools of the virus. *J Gen Virol.* 2017;98(3):413-21. doi: 10.1099/jgv.0.000704. PubMed PMID: 28073402.
34. Fomsgaard A, Christiansen C, Bodker R. First identification of tick-borne encephalitis in Denmark outside of Bornholm, August 2009. *Euro Surveill.* 2009;14(36). PubMed PMID: 19758543.
35. Gilbert L. Louping ill virus in the UK: a review of the hosts, transmission and ecological consequences of control. *Exp Appl Acarol.* 2016;68(3):363-74. doi: 10.1007/s10493-015-9952-x. PubMed PMID: 26205612.
36. Hansmann Y, Pierre Gut J, Remy V, Martinot M, Allard Witz M, Christmann D. Tick-borne encephalitis in eastern France. *Scand J Infect Dis.* 2006;38(6-7):520-6. doi: 10.1080/00365540600585073. PubMed PMID: 16798704.
37. Jahfari S, de Vries A, Rijks JM, Van Gucht S, Vennema H, Sprong H, *et al.* Tick-Borne Encephalitis Virus in Ticks and Roe Deer, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(6):1028-30. doi: 10.3201/eid2306.161247. PubMed PMID: 28518024; PubMed Central PMCID: PMCPMC5443429.
38. Laursen K, Knudsen JD. Tick-borne encephalitis: a retrospective study of clinical cases in Bornholm, Denmark. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(5):354-7. doi: 10.1080/00365540310005305. PubMed PMID: 12875531.
39. Levy M, Abi-Warde MT, Rameau AC, Fafi-Kremer S, Hansmann Y, Fischbach M, *et al.* [Tick-borne encephalitis in a child in a nonendemic country: A case report]. *Arch Pediatr.* 2016;23(10):1055-8. doi: 10.1016/j.arcped.2016.06.018. PubMed PMID: 27642148.
40. Oker-Blom N, Salminen A, Brummer-Korvenkontio M, Kaeaeriaainen L, Weckstroem P. Isolation of Some Viruses Other Than Typical Tick-Borne Encephalitis Viruses from *Ixodes ricinus* Ticks in Finland. *Ann Med Exp Biol Fenn.* 1964;42:109-12. PubMed PMID: 14229542.
41. Hubalek Z, Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol Res.* 2012;111(1):9-36. doi: 10.1007/s00436-012-2910-1. PubMed PMID: 22526290.

42. Traavik T. Tick- and mosquito-associated viruses in Norway. *Nat Inst Publ Hlth.* 1979;1-55.
43. Chastel C, Main AJ, Couatarmanac'h A, Le Lay G, Knudson DL, Quillien MC, *et al.* Isolation of Eyach virus (Reoviridae, Colorado tick fever group) from *Ixodes ricinus* and *I. ventralis* ticks in France. *Arch Virol.* 1984;82(3-4):161-71. PubMed PMID: 6508529.
44. Rehse-Kupper B, Casals J, Rehse E, Ackermann R. Eyach--an arthropod-borne virus related to Colorado tick fever virus in the Federal Republic of Germany. *Acta Virol.* 1976;20(4):339-42. PubMed PMID: 9824.
45. Moutailler S, Popovici I, Devillers E, Vayssier-Taussat M, Eloit M. Diversity of viruses in *Ixodes ricinus*, and characterization of a neurotropic strain of Eyach virus. *New Microbes New Infect.* 2016;11:71-81. doi: 10.1016/j.nmni.2016.02.012. PubMed PMID: 27158509; PubMed Central PMCID: PMC4845080.
46. Attoui H, Mohd Jaafar F, Biagini P, Cantaloube JF, de Micco P, Murphy FA, *et al.* Genus Coltivirus (family Reoviridae): genomic and morphologic characterization of Old World and New World viruses. *Arch Virol.* 2002;147(3):533-61. PubMed PMID: 11958454.
47. Chastel C. [Erve and Eyach: two viruses isolated in France, neuropathogenic for man and widely distributed in Western Europe]. *Bull Acad Natl Med.* 1998;182(4):801-9; discussion 9-10. PubMed PMID: 9673063.
48. Malkova D, Holubova J, Kolman JM, Marhoul Z, Hanzal F, Kulkova H, *et al.* Antibodies against some arboviruses in persons with various neuropathies. *Acta Virol.* 1980;24(4):298. PubMed PMID: 6106383.
49. Negredo A, de la Calle-Prieto F, Palencia-Herrejon E, Mora-Rillo M, Astray-Mochales J, Sanchez-Seco MP, *et al.* Autochthonous Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *N Engl J Med.* 2017;377(2):154-61. doi: 10.1056/NEJMoa1615162. PubMed PMID: 28700843.
50. Al-Abri SS, Abaidani IA, Fazlalipour M, Mostafavi E, Leblebicioglu H, Pshenichnaya N, *et al.* Current status of Crimean-Congo haemorrhagic fever in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region: issues, challenges, and future directions. *Int J Infect Dis.* 2017;58:82-9. doi: 10.1016/j.ijid.2017.02.018. PubMed PMID: 28259724.
51. Shimada S, Aoki K, Nabeshima T, Fuxun Y, Kurosaki Y, Shiogama K, *et al.* Tofla virus: A newly identified Nairovirus of the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan. *Sci Rep.* 2016;6:20213. doi: 10.1038/srep20213. PubMed PMID: 26863911; PubMed Central PMCID: PMC4809068.
52. Tokarz R, Williams SH, Sameroff S, Sanchez Leon M, Jain K, Lipkin WI. Virome analysis of *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis* ticks reveals novel highly divergent vertebrate and invertebrate viruses. *J Virol.* 2014;88(19):11480-92. doi: 10.1128/JVI.01858-14. PubMed PMID: 25056893; PubMed Central PMCID: PMC4178814.
53. Xia H, Hu C, Zhang D, Tang S, Zhang Z, Kou Z, *et al.* Metagenomic profile of the viral communities in *Rhipicephalus* spp. ticks from Yunnan, China. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121609. doi: 10.1371/journal.pone.0121609. PubMed PMID: 25799057; PubMed Central PMCID: PMC4370414.
54. Orkun O, Karaer Z, Cakmak A, Nalbantoglu S. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks in Turkey: A broad range tick surveillance study. *Infect Genet Evol.* 2017;52:59-66. doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.017. PubMed PMID: 28433738.
55. Erlandsson L, Rosenstjerne MW, McLoughlin K, Jaing C, Fomsgaard A. The microbial detection array combined with random Phi29-amplification used as a diagnostic tool for virus detection in clinical samples. *PLoS One.* 2011;6(8):e22631. doi: 10.1371/journal.pone.0022631. PubMed PMID: 21853040; PubMed Central PMCID: PMC3154197.
56. Rosenstjerne MW, McLoughlin KS, Olesen ML, Papa A, Gardner SN, Engler O, *et al.* The microbial detection array for detection of emerging viruses in clinical samples--a useful panmicrobial diagnostic tool. *PLoS One.* 2014;9(6):e100813. doi: 10.1371/journal.pone.0100813. PubMed PMID: 24963710; PubMed Central PMCID: PMC4070998.
57. Fridholm H, Ostergaard Sorensen L, Rosenstjerne MW, Nielsen H, Sellebjerg F, Bengard Andersen A, *et al.* Human pegivirus detected in a patient with severe encephalitis using a metagenomic pan-virus array. *J Clin Virol.* 2016;77:5-8. doi: 10.1016/j.jcv.2016.01.013. PubMed PMID: 26872326.



58. McMullan LK, Folk SM, Kelly AJ, MacNeil A, Goldsmith CS, Metcalfe MG, *et al.* A new phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *N Engl J Med.* 2012;367(9):834-41. doi: 10.1056/NEJMoal203378. PubMed PMID: 22931317.
59. Puchhammer-Stockl E, Kunz C, Mandl CW, Heinz FX. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin Diagn Virol.* 1995;4(4):321-6. PubMed PMID: 15566853.
60. Mazelier M, Rouxel RN, Zumstein M, Mancini R, Bell-Sakyi L, Lozach PY. Uukuniemi Virus as a Tick-Borne Virus Model. *J Virol.* 2016;90(15):6784-98. doi: 10.1128/JVI.00095-16. PubMed PMID: 27194760; PubMed Central PMCID: PMC4944291.
61. Rodriguez LL, Maupin GO, Ksiazek TG, Rollin PE, Khan AS, Schwarz TF, *et al.* Molecular investigation of a multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57(5):512-8. PubMed PMID: 9392588.
62. Lambert AJ, Lanciotti RS. Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S segment species identification of 47 viruses of the Orthobunyavirus, Phlebovirus, and Nairovirus genera of the family Bunyaviridae. *J Clin Microbiol.* 2009;47(8):2398-404. doi: 10.1128/JCM.00182-09. PubMed PMID: 19535518; PubMed Central PMCID: PMC2725646.
63. Kazimírová, M., Thangamani, S., Bartíková, P., Hermance, M., Holíková, V., Štibrániová, I., and Nuttall, P.A. Tick-Borne Viruses and Biological Processes at the Tick-Host-Virus Interface. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 ;Jul26;7:339. doi: 10.3389/fcimb.2017.00339. PubMed PMID: 28798904 ; PMCID: PMC5526847.

## **2. Adaptation de la PCR microfluidique en temps réel au criblage des arbovirus d'intérêt de la zone Caraïbe**

Suite au développement de l'outil de détection des arbovirus, mon travail de thèse à consister à adapter le système à l'étude des virus transmis par les tiques dans les caraïbes. L'adaptation de la technologie consistait au développement et à l'ajout de sondes/amorces permettant la détection de :

(1) trois nouveaux virus pathogènes pour l'homme et transmis par les tiques décrits récemment : le Heartland virus, le Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) et le Bourbon virus (Elliott and Brennan 2014 ; Kosoy *et al.*, 2015).

(2) quatre virus détectés en Guadeloupe et en Martinique par NGS dont on souhaitait étudier le taux d'infection dans nos échantillons de tiques individuelles: le Changping tick virus-Like, le Wuhan tick virus-Like, le Lihan tick virus-Like et enfin le Jingmenvirus-Like (voir Chapitre 1 de ce manuscrit).

(3) trois virus endémique dans les Antilles Françaises : le virus du Chikungunya, le virus de la Dengue, le virus du Zika. Ces oligonucléotides ont été réalisés par Léna Yousfi dans le cadre d'un projet visant à développer une puce de détection adaptée à la recherche des virus transmis par les moustiques (Projet PTR ANSES-Institut Pasteur et Projet H2020 Zikalliance). Bien qu'associés aux moustiques, il nous semblait intéressant de tester la présence de ces virus au sein de nos échantillons de tiques sachant que ces virus circulent de manière endémique et/ou épidémique dans notre zone d'étude.

### **2.1. Matériel et Méthode**

#### ***2.1.1. Collectes et traitement des échantillons de tiques de Guadeloupe et de Martinique***

Les tiques analysées dans cette partie sont les mêmes que celles utilisées pour le criblage des bactéries et parasites, à savoir les 137 et 175 spécimens d'*Amblyomma variegatum* et de *Rhipicephalus microplus* collectés en Guadeloupe et les 285 *Rhipicephalus microplus* collectés en Martinique. Les protocoles de broyat et d'extraction des acides nucléiques (ADN/ARN) de ces tiques sont également disponibles dans le chapitre précédent (voir Chapitre 2a « Criblage des bactéries et parasites dans les tiques »).

### ***2.1.2. Rétro-transcription des ARN, pré-amplification, et PCR microfluidique en temps réel***

Les protocoles de rétro-transcription des ARN en ADNc, de pré-amplification, et enfin de PCR microfluidique en temps réel sont les mêmes que ceux décrits dans la publication concernant le développement de la puce de détection arbovirus (voir la première partie de ce chapitre « Développement de la PCR en temps réel à haut débit permettant le criblage des arbovirus dans les tiques »). La seule modification apportée est l'ajout des nouveaux designs listés dans les Tableaux 1, 2 et 3.

### ***2.1.3. Calcul des Taux d'infection***

La méthode de calcul des taux d'infection est la même que celle décrite lors de la recherche des bactéries et parasites dans les échantillons de tique de Guadeloupe et de Martinique (voir Chapitre 2a « Criblage des bactéries et parasites dans les tiques »).

### ***2.1.4. Sondes et Amorces ajoutées***

Les Sondes/Amorces ajoutées afin d'adapter l'outil de détection à cette étude sont répertoriées dans les Tableau 1, 2 et 3.

### ***2.1.5. Recherche d'éléments viraux endogènes***

Les virus décrit en NGS, le Changping tick virus-Like, le Wuhan tick virus-Like, le Jingmenvirus-Like et le Lihan tick virus-Like, ont également été recherchés dans les échantillons d'ADN des tiques de Guadeloupe et de Martinique à l'aide des sondes et amorces nouvellement développées (Tableau 1). Ces oligonucléotides avaient été ajoutés à la puce de détection des bactéries et parasites, permettant ainsi de cribler les échantillons d'ADN des tiques des Antilles Françaises (Chapitre 2a de ce manuscrit).

Les résultats obtenus en PCR microfluidique en temps réel sur les échantillons d'ADN des tiques des Antilles Françaises ont été confirmés par PCR en temps réel Taqman à l'aide du kit LightCycler® 480 Probe Master Mix 1× (Roche Applied Science, Germany), et de l'appareil LightCycler® 480 (LC480) (Roche Applied Science, Germany). Les réactions ont

été réalisées dans un volume final de 12 µL à l'aide de 200 nM d'amorces et de sonde, et 2 µL d'ADN ont été ajoutés. Le programme de PCR utilisé fut le suivant : 95°C pendant 5 min, 45 cycles à 95°C pendant 10 s et 60°C pendant 15 s, et un cycle final à 40°C pendant 10 s. Les amplicons obtenus ont été envoyés au séquençage chez Eurofins MWG Operon (BIOMNIS-EUROFINS GENOMICS, France). Les séquences obtenues ont été assemblées à l'aide du logiciel BioEdit software (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), puis nous avons recherché des identités de séquence avec la base de données nucléotidiques du NCBI (National Center for Biotechnology information) à l'aide du logiciel Blast.

**Tableau 1 : Amorces/Sondes ciblant les virus détectés en NGS (Chapitre 1 de ce manuscrit), ajoutées à la puce de détection des Arbovirus pour les criblages des agents pathogènes des tiques de Guadeloupe et de Martinique.**

Virus	Référence	Cible	Nom oligonucléotide	Séquence (5'-3')	Position	Amplicon (pb)
Changping Tick Virus-Like	NC_028260.1	Gène putatif de l'ARN polymérase	CTVL_Poly_F	CACATGTCTCGGAGCGAGG	2201-2222	136
			CTVL_Poly_R	TTCCTGAACGTCTGAGGCTG	2336-2317	
			CTVL_Poly_S	AAAGCTATTCGGGCACGTCATTAAAGTGG	2223-2251	
Wuhan Tick Virus-Like	NC_028266.1	Gène putatif de l'ARN polymérase	WTVL_Poly_F	GACCCAGGGAGAGTTAGATG	1781-1800	119
			WTVL_Poly_R	ACCTGCTGTTCCATGAGCTC	1899-1880	
			WTVL_Poly_S	TAGCCCGTAAACTCTGGGATTTCTGATGC	1830-1801	
Jingmenvirus-Like Segment 1	NC_024113.1	Gène de la protéine NS5-like	JVL_Seg1_F	ACGTGAAGGAAATATCATTCTGC	2323-2345	100
			JVL_Seg1_R	GCGAATATCTCTCCACGTC	2422-2403	
			JVL_Seg1_P	TCCACAGGTACTGGCCGTAAGTA	2346-2371	
Jingmenvirus - Like Segment 2	NC_024112.1	Gène putatif de la glycoprotéine	JVL_Seg2_F	ATCTTCAGCGCTATCACCGC	320-339	95
			JVL_Seg2_R	CGGTTTTGTCGGCGAATGATG	414-394	
			JVL_Seg2_P	ATTGCAGCGATGAGTGGGACGAGCG	393-369	
Jingmenvirus - Like Segment 3	KJ001581.1	Gène putatif de la protéine NS3-like	JVL_Seg3_F	CGTGGGGAAGGACAAAAGC	1484-1502	102
			JVL_Seg3_R	CCTTATCTCTCCGCTAGTGG	1562-1543	
			JVL_Seg3_P	AAGGCAGCTTGCATAGAGATGACCGC	1503-1528	
Jingmenvirus - Like Segment 4	NC_024111.1	Gène putatif de la protéine de membrane	JVL_Seg4_F	ACAGCGTGCTAGTCTTCGC	2324-2342	79
			JVL_Seg4_R	GGGAGTTGAAAGTGATGCCA	2425-2405	
			JVL_Seg4_P	AGGCACGTTTGTGATGGTTCAGGACAG	2343-2369	
Lihan Tick Virus -Like Segment L	KM817672.1	Gène putatif de l'ARN polymérase	LTVL_SegL_F	ACATGGGTGTATCCAACACAC	5428-5448	127
			LTVL_SegL_R	ACCGACATAGCCCATCGAG	5555-5537	
			LTVL_SegL_P	ACAGGAGTCTAAACAAGGACGGGTGCAT	5449-5476	
Lihan Tick Virus -Like Segment S	KM817736.1	Gène putatif de la protéine de nucléocapside	LTVL_SegS_F	TTGACGTTCTACTCGGCCAC	1019-1038	123
			LTVL_SegS_R	TACTGCCTGCGTCATGAGTG	1141-1122	
			LTVL_SegS_P	AATTCTAGCCGCTCACCATTCTGCCCA	1039-1065	

**Tableau 2 : Amorces/Sondes permettant la détection de trois virus transmis par les tiques, ajoutées à la puce virus.**

Virus	Référence	Cible	Nom oligonucléotide	Séquence (5'-3')	Position	Amplicon (pb)
Heartland virus	KC466563.1	Protéine non structurale (NSs)	HRTV_Nns_SegS_F	GCTGCTCATTTATTCTTCTCCC	151-172	81
			HRTV_Nns_SegS_R	CCTGTGGAAGAAACCTCTCC	231-212	
			HRTV_Nns_SegS_S	TCAAGAACACCTGGGCAGTCGAGAC	173-197	
Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus	AB985637.1	ARN polymérase	SFTSV_rdrp_L_F	AACATCCTGGACCTTGCATCC	2078-2098	123
			SFTSV_rdrp_L_R	CAATGTGGCCATCTTCTCCAG	2200-2181	
			SFTSV_rdrp_L_S	ATGAAGGCTACAAGCAACTTTCCAAAGACTG	2099-2130	
Bourbon virus	KP657748.1	ARN polymérase	BOUV_PA_Seg3_F	GCTTCCAAGGTACATCCTGC	156-175	106
			BOUV_PA_Seg3_R	CAGCATGTCAGGAATGTTTGG	261-241	
			BOUV_PA_Seg3_S	TCACATGGTGCCCGAAAGAAGTTGTAG	176-202	

**Tableau 3 : Amorces/Sondes développées par Léna Yousfi (Projet PTR ANSES-Institut Pasteur et Projet H2020 Zikalliance) ciblant le virus du Chikungunya, le virus de la Dengue, et le virus du Zika et ajoutées à la puce de détection des arbovirus pour le criblage des agents pathogènes des tiques de Guadeloupe et de Martinique.**

Virus	Cible	Nom oligonucléotide	Séquence (5'-3')	Position	Amplicon (pb)
Chikungunya virus (west africain)	NSP	Chik_WAfri_F	CGAACTACATATCCGGCACC	5942-5961	130
		Chik_WAfri_R	TGATTTGGTACGACGCAACTGT	6071-6050	
		Chik_WAfri_P	AGTGTACTCACCCCCAATCAATATCCGAC	5962-5990	
Chikungunya virus (asie)	NSP	Chik_Asia_F	TGATCAAATGACCGGCATCCT	1041-1061	105
		Chik_Asia_R	CGTTGCGTTCTGCCGTTAAC	1145-1126	
		Chik_Asia_P	TGCTACAGAAGTCACGCCGAGGATG	1062-1087	
Chikungunya virus (inde/ East Central and South African)	NSP	Chik_IndECSA_F	AGGAAGTCCACGAGGAGAAG	5724-5753	159
		Chik_IndECSA_R	TTAGTCTCTGGATGATTGCTGC	5882-5861	
		Chik_IndECSA_P	TGTTACCCACCTAAGCTGGATGAAGCAAAG	5754-5773	
Chikungunya virus (East Central and South African)	NSP	Chik_ECSA_F	ACACAACCCCGTTCATGTACA	595-615	192
		Chik_ECSA_R	CTACTGAGAACAGCACACGG	786-770	
		Chik_ECSA_P	ATGCCATGGCGGGTGCCTACCC	616-637	
Dengue 1	3'UTR	Deng_1_F	AACCCATGGAAGCTGTACGC	10478-10497	102
		Deng_1_R	CTAGTCCTTACCACAGGGT	10598-10579	
		Deng_1_P	ACAGCTTCCCCTGGTGTGGGCC	10578-10556	
Dengue 2	NS5-3'UTR	Deng_2_F	AGAAGAGAAGAGGAAGAGGCA	10237-10257	121
		Deng_2_R	TGGCCTGACTTCTTTTAACGTC	10375-10364	
		Deng_2_P	CTTGGACGGGGCTCACAGGTAGC	10353-1031	
Dengue 3	NS5-3'UTR	Deng_3_F	GAAGAGATTACAGGAAGGAGGA	10222-10242	139
		Deng_3_R	GGCCTGACTTCTTCTTTAACG	10366-10346	
		Deng_3_P	TCCTTGGACGGGGCTCACAGGC	10345-10324	
Dengue 4	C/prM	Deng_4_F	TGGATTCAGGAAGGAGATAGG	344-364	145
		Deng_4_R	GTTCGCCATCTCTTGTGACA	468-448	
		Deng_4_P	CCGCATGCTGAACATCTTGAACGGGA	365-390	
Zika	Glycoprotéine	Zika_VI_F	GCATCAGGTGCATAGGAGTC	969-988	125
		Zika_VI_R	TTGATGCCTCATAGCAGTAGGA	1163-1142	
		Zika_VI_P	AGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTATGTCA	989-1018	
	Polyprotéine	zika2_F	AATGACACATGGAGGCTGAAG	3095-3116	195
		zika2_R	TGTGTGAGACTTTGGCCATTC	3165-3144	
		zika2_P	AGGGCCCACTGATTGAGATGAAAACATGT	3117-3147	
	Protéine de capside	Zika_VII_F	GCAATCAAGCCATCACTGGG	172-191	71
		Zika_VII_R	GTCTCTTCTCTCTCTCTAG	310-290	
		Zika_VII_P	CATTGATTATTCTCAGCATGGCAGCCAGATC	289-259	

## 2.2. Résultats

### 2.2.1. Criblage des arbovirus dans les tiques de Guadeloupe et de Martinique

Parmi les 597 tiques collectées en Guadeloupe et Martinique, aucun des 28 virus d'intérêt médical ou vétérinaire ciblé par la puce de détection n'a été détecté. Par contre, les quatre virus décrit en NGS ont bien été retrouvés dans les échantillons de tiques individuelles de Guadeloupe et de Martinique (Tableau 4).

**Tableau 4 : Nombre de tiques positives pour les virus testés en PCR microfluidique en temps réel à haut débit sur les échantillons d'ADNc, sur 137 *Amblyomma variegatum*, 166 *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et 281 *Rhipicephalus microplus* de Martinique. TI : Taux d'infection. Certains échantillons correspondent à des pools de 2 à 4 spécimens de tiques, un taux minimal et un taux maximal d'infection ont ainsi été calculés.**

	Guadeloupe		Martinique
	<i>Amblyomma variegatum</i> (TI)	<i>Rhipicephalus microplus</i> min – max (TI)	<i>Rhipicephalus microplus</i> min – max (TI)
Changping tick virus-Like	33 (24,1%)	1 (0,6%) - 2 (1,2%)	0
Wuhan tick virus-Like	20 (14,6%)	106 (63,9%) - 154 (92,8%)	260 (92,5%) - 264 (94%)
Jingmenvirus-Like Segment 1	0	3 (1,8%) - 5 (3%)	75 (26,7%) - 76 (27%)
Jingmenvirus-Like Segment 2	2 (1,5%)	39 (23,5%) - 59 (35,5%)	204 (72,6%) - 206 (73,3%)
Jingmenvirus-Like Segment 3	3 (2,2%)	29 (17,5%) - 49 (29,5%)	93 (33,1%) - 94 (33,5%)
Jingmenvirus-Like Segment 4	7 (5,1%)	41 (24,7%) - 70 (42,2%)	216 (76,9%) - 221 (78,6%)
Lihan tick virus-Like Segment L	19 (13,9%)	106 (63,9%) - 155 (93,4%)	235 (83,6%) - 238 (84,7%)
Lihan tick virus-Like Segment S	17 (12,4%)	108 (65,1%) - 157 (94,6%)	255 (90,7%) - 260 (92,5%)

#### 2.2.1.1 Le Changping tick virus-Like (CTVL)

Le Changping tick virus-Like (CTVL) présente un génome de type ARN non segmenté et circulaire. A l'aide de la séquence génomique obtenue en Chapitre 1 de ce manuscrit, j'ai développé un ensemble de sonde/amorces ciblant une partie de l'ORF de l'ARN polymérase (Tableau 1). Le CTVL a été retrouvé uniquement dans les tiques collectées en Guadeloupe (Tableau 4). Il a été détecté dans 33 tiques *Amblyomma variegatum*

collectées sur 15 animaux provenant de 10 élevages guadeloupéens. Les échantillons positifs présentaient des Ct compris entre 13 et 28. Enfin le CTVL a également été détecté dans un pool de deux tiques *Rhipicephalus microplus* collectées sur un seul animal, présentant un Ct d'environ 27. Ce même animal a par ailleurs été l'hôte de tiques *Amblyomma variegatum* positives.

Ces résultats suggèrent que le CTVL présenterait une préférence d'hôte vecteur, étant fortement associé aux *Amblyomma variegatum*. L'absence de détection du CTVL dans les échantillons de *Rhipicephalus microplus* de Martinique renforce l'idée d'une préférence vectorielle.

#### **2.2.1.2 Le Wuhan tick virus-Like (WTVL)**

Le Wuhan tick virus-Like (WTVL) présente également un génome de type ARN non segmenté et circulaire. A l'aide de la séquence génomique obtenue en Chapitre 1 de ce manuscrit, j'ai développé un ensemble de sonde/amorces ciblant une partie de l'ORF de l'ARN polymérase (Tableau 1). Le WTVL a été détecté dans les deux espèces de tiques provenant des deux îles étudiées (Tableau 4).

En Guadeloupe, le virus a été détecté dans 20 tiques *Amblyomma variegatum*, collectées sur 10 animaux (neuf élevages). Les Ct obtenus étaient majoritairement compris entre 20 et 25. 106 à 154 tiques *Rhipicephalus microplus* collectées sur 19 animaux (11 élevages) étaient positives pour le WTVL. Parmi les 10 animaux ayant servi de support à la collecte des *Amblyomma variegatum*, six ont également été les hôtes de tiques *Rhipicephalus microplus* collectées, et toutes étaient positives pour le WTVL.

En Martinique, où seuls des *Rhipicephalus microplus* ont été collectés, au moins 92% des tiques étaient positives pour ce virus. Les Ct obtenus pour les échantillons de *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et de Martinique étaient en grande majorité compris entre 7 et 15.

Ainsi, le WTVL semble capable d'infecter les deux espèces de tiques étudiées. Cependant, les valeurs élevées de Ct retrouvées chez les tiques *Amblyomma variegatum* positives, associées à un taux d'infection plus faible, suggèrent que les *Rhipicephalus microplus* pourraient être des vecteurs plus efficaces du WTVL.

### 2.2.1.3 Le Jingmenvirus-Like (JVL)

Le Jingmen virus-Like (JVL) est un virus de type ARN linéaire, à quatre segments. A l'aide des séquences génomiques du JVL obtenues en Chapitre 1 de ce manuscrit, j'ai développé des oligonucléotides permettant la détection de chacun des quatre segments viraux (Tableau 1). Le JVL a été détecté dans les deux espèces de tiques et dans les deux îles (Tableau 4). Cependant, les quatre segments n'ont pas été retrouvés de façon constante au sein des échantillons. Certains échantillons de tique étaient positifs soit pour un segment, soit pour deux, trois ou quatre. Les taux d'infection étaient variables selon le segment génomique ciblé (Tableau 4). Par exemple, on a constaté clairement que le segment 1 était sous-représenté, notamment par rapport aux segments 2 et 4 qui présentaient des taux de présence plus élevés. Ces résultats peuvent être dus à une différence de sensibilité entre les différents sets d'amorces/sonde utilisés, et/ou à une différence en termes de quantité et d'expression entre les différents segments d'ARN. En effet il a été démontré chez certains virus, dont celui de la fièvre de la Vallée du Rift, que les différents segments qui constituent le virus pouvait être présents et transcrits en quantité variable, notamment avec une plus grande quantité pour les ARN codant les protéines de structures comparés aux ARN codant les protéines non structurales dans les cellules infectées (Gauliard *et al.*, 2006). Ceci pourrait donc expliquer que dans cette étude, le segment 1 du JVL qui code la protéine non structurale qui correspond à l'ARN polymérase soit sous-exprimé et donc moins détecté que les segments 2 et 4 qui codent les protéines de structures.

En Guadeloupe, les tiques *Amblyomma variegatum* semblent peu infectées par le JVL. Le segment 1 n'a pas été détecté. Le segment 2 a été détecté dans 2 tiques collectées sur le même animal. Le segment 3 a été détecté dans 3 tiques collectées sur deux animaux. Et finalement le segment 4 a été détecté dans sept tiques collectées sur cinq animaux différents. Les Ct reportés étaient tous élevés, majoritairement supérieurs à 26. A l'exception d'un animal, tous étaient aussi l'hôte de *Rhipicephalus microplus* positives.

En Guadeloupe, trois à cinq *Rhipicephalus microplus* étaient positives pour le segment 1, 39 à 59 tiques pour le segment 2, 29 à 49 tiques pour le segment 3 et finalement 41 à 70 tiques pour le segment 4. Globalement les tiques positives ont toutes été collectées sur les mêmes animaux, provenant de six élevages. La Figure 1 permet de se rendre compte visuellement du nombre d'échantillons de tiques positifs pour un segment donné en fonction de l'hôte et de l'élevage d'origine.



En Martinique, 75 à 76 *Rhipicephalus microplus* récoltées sur 19 animaux étaient positives pour le segment 1, 204 à 206 pour le segment 2, 93 à 94 pour le segment 3, et 216 à 221 pour le segment 4. Les tiques positives ont été collectées sur 28 des 29 animaux intégrés au plan d'échantillonnage, indiquant une large distribution du JVL dans les tiques de Martinique. La Figure 2 permet de se rendre compte visuellement du nombre d'échantillons de tiques positifs pour un segment donné en fonction de l'hôte et de l'élevage d'origine.

Ainsi, bien que quelques échantillons d'*Amblyomma variegatum* aient été positifs pour le JVL, le virus semble présenter une affinité supérieure pour les *Rhipicephalus microplus*.

<i>Rhipicephalus microplus</i>		Jingmenvirus like			
Echantillons	Animal	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4
A7-P1-49	0678				
B7-P1-50					
C7-P1-51					
D7-P1-52					
E7-P1-53					
F7-P1-54					
F10-P1-78					
G10-P1-79					
H10-P1-80					
A11-P1-81					
C10-P1-75	02				
D10-P1-76					
F3-P3-210	2				
B4-P3-214					
D4-P3-216	9721				
B5-P3-222					
G7-P3-243	7306				
H7-P3-244					
A8-P3-245					
B8-P3-246					
C8-P3-247					
D8-P3-248					
F8-P3-250					
G8-P3-251					
H8-P3-252					
A9-P3-253					
B9-P3-254					
C9-P3-255					
D9-P3-256					
E9-P3-257					
F9-P3-258					
G9-P3-259					
H9-P3-260					
A10-P3-261					
E7-P3-241	7310				
B5-P1-34	0822				
C5-P1-35					
D5-P1-36					
H3-P1-24	1915				
D2-P3-200	8272				
E2-P3-201					
F2-P3-202					
G2-P3-203					
H2-P3-204					
A3-P3-205					
B3-P3-206					
C3-P3-207					
D3-P3-208					
E3-P3-209					

Figure 6. Echantillons de tiques *Rhipicephalus microplus* collectées en Guadeloupe positifs pour les segments 1 et/ou 2 et/ou 3 et/ou 4 du Jingmenvirus-Like. Les Cases noires représentent les résultats positifs.

Echantillons	Animal	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4
E1-P5-381	32AL				
F1-P5-382					
E9-P4-351	40AA				
F9-P4-352					
G5-P4-321	80AG				
G4-P4-313	11AE				
H4-P4-314					
A4-P6-495	27AJP				
B4-P6-496					
H3-P6-494					
A5-P6-503					
B9-P4-348	30BJH				
C5-P6-505					
C9-P4-349					
D9-P4-350					
A6-P6-511	40BW				
A7-P5-425					
A7-P6-519					
A8-P5-433					
A9-P4-347					
A9-P5-441					
A9-P6-535					
B6-P6-512					
B7-P4-332					
B7-P5-426					
B8-P5-434					
B9-P5-442					
C6-P6-513					
C7-P4-333					
C7-P5-427					
C8-P5-435					
C9-P5-443					
D6-P6-514					
D7-P4-334					
D7-P5-428					
D8-P4-342					
D8-P5-436					
D8-P6-530					
D9-P5-444					
E6-P5-421					
E6-P6-515					
E7-P4-335					
E7-P5-429					
E8-P4-343					
E8-P5-437					
E8-P6-531					
E9-P5-445					
F6-P5-422					
F6-P6-516					
F7-P4-336					
F7-P5-430					
F8-P4-344					
F8-P5-438					
F8-P6-532					
G6-P5-423					
G6-P6-517					
G7-P5-431					
G8-P4-345					
G8-P5-439					
G8-P6-533					
H6-P5-424					
H6-P6-518					
H7-P5-432					
H8-P4-346					
H8-P5-440					
H8-P6-534					
F9-P5-446	31BG				
C6-P4-325	80CNR				
D6-P4-326					
A8-P4-339	80DN				
B8-P4-340					
G7-P4-337					
H7-P4-338					
C8-P4-341	23GC				
A7-P4-331					
D4-P4-310	26GRM				
C4-P6-497	80HDG				
D4-P6-498					
E4-P6-499					
F4-P6-500					
G4-P6-501	31HG				
C11-P4-365					
D11-P4-366					
E11-P4-367					
F11-P4-368					
G11-P4-369					
H11-P4-370					

D12-P5-468	28LLG				
E12-P5-469					
F12-P5-470					
A1-P5-377	12MB				
B1-P5-378					
C1-P5-379					
D12-P4-374					
D1-P5-380					
E12-P4-375	80MMA				
F12-P4-376					
A10-P4-355					
A11-P4-363					
B10-P4-356					
B11-P4-364					
C10-P4-357					
D10-P4-358					
E10-P4-359					
F10-P4-360					
G10-P4-361					
G9-P4-353					
H10-P4-362					
H9-P4-354	70MG				
A4-P5-401					
A5-P5-409					
A6-P5-417					
B4-P5-402					
B5-P5-410					
B6-P5-418					
C4-P5-403					
C5-P5-411					
C6-P5-419					
D4-P5-404					
D5-P5-412					
D6-P5-420					
E3-P5-397					
E4-P5-405					
E5-P5-413					
E5-P6-507					
F3-P5-398					
F4-P5-406					
F5-P5-414					
F5-P6-508					
G3-P5-399					
G4-P5-407					
G5-P5-415					
G5-P6-509					
H3-P5-400					
H4-P5-408					
H5-P5-416					
H5-P6-510					
B5-P4-316	31MMC				
G1-P6-477	80HLC				
A11-P3-269	31OR				
A12-P3-277					
A2-P4-291					
A3-P4-299					
A4-P4-307					
B10-P3-262					
B11-P3-270					
B12-P3-278					
B1-P4-284					
B2-P4-292					
B3-P4-300					
B4-P4-308					
C10-P3-263					
C11-P3-271					
C12-P3-279					
C2-P4-293					
C3-P4-301					
C4-P4-309					
D10-P3-264					
D11-P3-272					
D12-P3-280					
D1-P4-286					
D2-P4-294					
D3-P4-302					
E10-P3-265					
E11-P3-273					
E12-P3-281					
E2-P4-295					
E3-P4-303					
F11-P3-274					
F12-P3-282					
F2-P4-296					
G10-P3-267					
G11-P3-275					
G2-P4-297					
H10-P3-268					
H11-P3-276					
H2-P4-298					

H3-P4-306					
F3-P4-304					
A1-P4-283					
A1-P6-471					
A3-P6-487					
B1-P6-472					
B3-P6-488					
D3-P6-490					
E3-P6-491					
F2-P6-484					
F3-P6-492					
G3-P6-493					
C1-P6-473					
D2-P6-482					
H1-P5-384					
A12-P4-371					
B12-P4-372					
C12-P4-373					
E1-P4-287					
F1-P4-288					
G1-P4-289					
H1-P4-290					
G7-P6-525					
E6-P4-327					
F6-P4-328					
G6-P4-329					
H6-P4-330					
A6-P4-323					
B6-P4-324					
H5-P4-322					
A10-P5-449					
A11-P5-457					
A12-P5-465					
B10-P5-450					
B11-P5-458					
B12-P5-466					
C10-P5-451					
C12-P5-467					
D10-P5-452					
D11-P5-460					
E11-P5-461					
F11-P5-462					
G10-P5-455					
G11-P5-463					
G9-P5-447					
H11-P5-464					
H9-P5-448					
A8-P6-527					
B7-P6-520					
B9-P6-536					
E10-P5-453					
H10-P5-456					
H2-P6-486					

Figure 2. Echantillons de tiques *Rhipicephalus microplus* collectées en Martinique positifs pour les segments 1 et/ou 2 et/ou 3 et/ou 4 du Jingmenvirus-Like. Les Cases noires représentent les résultats positifs.

#### 2.2.1.4 Le Lihan tick virus-Like (LTVL)

Finalement, le Lihan tick virus-Like (LTVL), a également été détecté dans les deux îles et chez les deux espèces de tiques. Le LTVL est un *Phlebovirus*, mais seuls les segments S et L ont été identifiés en NGS. J'ai donc mis au point des oligonucléotides permettant la détection de chacun de ces deux segments génomiques (Tableau 1). Les segments L et S ont été majoritairement détectés simultanément au sein des échantillons positifs (Tableau 4).

En Guadeloupe, 19 et 17 tiques *Amblyomma variegatum* étaient positives pour le segment L et S respectivement. Les tiques positives ont été collectées sur six animaux (cinq

élevages). Quatre des six animaux ont également servi à la collecte de *Rhipicephalus microplus* positives (aucune tique de cette espèce n'ayant été prélevée sur les deux autres animaux). Entre 106 et 155 tiques *Rhipicephalus microplus* collectées en Guadeloupe étaient positives pour les segments L, et entre 108 et 157 pour le segment S. Les tiques provenaient de 12 élevages différents et ont été prélevées sur 19 animaux.

En Martinique, entre 235 et 238 tiques *Rhipicephalus microplus* étaient positives pour le segment L et entre 255 et 260 pour le segment S du Lihan tick virus-Like. Les tiques positives ont été prélevées sur la totalité des animaux échantillonnés (excepté un animal pour le segment L).

Ainsi, le LTVL semble capable d'infecter les deux espèces de tiques étudiées. Cependant, au regard des taux d'infection qui semblent plus élevés chez les *Rhipicephalus microplus*, cette espèce de tique pourrait être un vecteur plus efficace du LTVL.

### **2.2.2. Recherche d'éléments viraux endogènes**

Les éléments viraux endogènes (EVEs) correspondent à l'intégration de l'ADN viral ou de la copie ADNc de l'ARN viral dans le génome de l'hôte, ici la tique. Généralement l'endogénéisation du virus au niveau des cellules germinales, permet la transmission verticale de ces EVEs et leur maintien dans une population (Feschotte and Gilbert, 2012). Des EVEs ont été décrits dans de nombreux génomes eucaryotes, dont ceux d'arthropodes et de tiques (Bell-Sakyi and Attoui 2013). Les EVEs, une fois intégrés au génome de l'hôte, deviennent de l'ADN « fossile », qui perd sa capacité à redonner un virus répliquatif (Bell-Sakyi and Attoui 2013).

Les quatre virus que nous avons identifiés par séquençage (voir Chapitre 1 de ce manuscrit) et que nous avons ensuite recherchés par PCR microfluidique en temps réel, n'ont donc été décrits que sur la base d'identification de séquence nucléotidique. Ainsi, on ne peut exclure l'hypothèse que ces virus puissent être des EVEs. Afin d'explorer la présence potentielle de séquences virales intégrées au génome de la tique, j'ai recherché la présence des quatre virus dans les échantillons ADN des tiques collectées en Guadeloupe et en Martinique (Tableau 5).

**Tableau 5 : Recherche d'éléments viraux endogènes. Nombre de tiques positives pour les virus testés en PCR en temps réel à haut débit sur les échantillons d'ADN, sur 137 *Amblyomma variegatum*, 166 *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et 281 *Rhipicephalus microplus* de Martinique. TI : Taux d'infection. Certains échantillons de tiques *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et de Martinique correspondent à des groupes de 2 à 4 spécimens de tiques, un taux minimal et un taux maximal d'infection ont ainsi été calculés.**

	Guadeloupe		Martinique
	<i>Amblyomma variegatum</i> (TI)	<i>Rhipicephalus microplus</i> min – max (TI)	<i>Rhipicephalus microplus</i> min – max (TI)
Changping tick virus-Like	0	1 (0,6%) - 2 (1,2%)	0
Wuhan tick virus-Like	0	42 (25,3%) - 60 (36,1%)	87 (31%) - 90 (32%)
Jingmenvirus-Like Segment 1	0	0	3 (1,1%)
Jingmenvirus-Like Segment 2	0	0	24 (8,5%)
Jingmenvirus-Like Segment 3	0	4 (2,4%) - 7 (4,2%)	8 (2,8%)
Jingmenvirus-Like Segment 4	0	1 (0,6%) - 2 (1,2%)	16 (5,7%)
Lihan tick virus-Like Segment L	0	1 (0,6%) - 2 (1,2%)	18 (6,4%)
Lihan tick virus-Like Segment S	0	0	1 (0,4%)

Par contre nous avons obtenus des amplifications inattendues dans les échantillons de tiques *Rhipicephalus microplus* (Tableau 5). Le CTVL et le LTVL ont été détectés ponctuellement dans un échantillon de *Rhipicephalus microplus*, de Guadeloupe et de Martinique respectivement. Le JVL a été détecté dans un à 18 échantillons de *Rhipicephalus microplus*, à des taux d'infection clairement inférieurs à ceux obtenus en analysant les ADNc (Tableau 4 et 5). Enfin le WTVL, est le virus qui a été le plus fréquemment détecté, dans 42 à 90 échantillons d'ADN de *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et de Martinique.

Les échantillons positifs en ADN, présentaient des Ct élevés, généralement supérieurs à 24, et correspondaient en grande partie à des échantillons qui étaient également positifs en ADNc, et qui présentaient des Ct très faibles, inférieurs à 10. Ces résultats suggèrent soit (1) que certains des virus détectés en NGS peuvent présenter des copies de génome viral intégrées au génome de la tique, et/ou (2) les amplifications observées sont des amplifications non spécifiques, et/ou (3) une contamination en ARN des échantillons. En effet, sachant que les ADN et les ARN ont été extraits en même temps, il est possible que les amplifications des virus observées en ADN correspondent en fait à l'amplification de contaminant ARN.

Nous avons tenté de confirmer les résultats obtenus par PCR en temps réel suivi d'un séquençage des amplicons. Les résultats de PCR en temps réel étaient négatifs pour les échantillons positifs au CTVL et au LTVL testés. Par contre nous avons obtenu, 10 séquences WTVL de 121 pb, les séquences étaient 100% identiques entre elles, et présentaient 98% d'identité pour 99% de couverture avec la séquence de référence du Wuhan tick virus 2 (KM817611.1). De plus nous avons également obtenu une séquence correspondant aux segments 1 et 4 du JVL, de 105 pb chacune, présentant respectivement 86 % d'identité pour 95% de couverture avec le segment 1 du Jingmen Tick Virus (KJ001579.1) et 93% d'identité pour 97% de couverture avec le segment 4 du Jingmen Tick Virus (KX377516.1).

Ces résultats semblent indiquer que les virus sont bien détectés dans nos échantillons, et que les amplifications ne correspondent pas à des signaux non spécifiques. Ainsi, soit les virus détectés en NGS peuvent présenter des séquences génomiques intégrées au génome de la tique, soit les amplifications sont dues à la présence de contamination en ARN des échantillons.

### **3. Discussion**

A l'aide de la PCR microfluidique en temps réel nous avons pu explorer la situation épidémiologique de 28 virus d'intérêt médical et vétérinaire et de quatre virus détectés en NGS au sein de nos échantillons de tiques de Guadeloupe et de Martinique.

L'absence notable de virus d'importance sanitaire dans nos échantillons de tiques des Antilles Françaises n'est pas si surprenante. En effet, les maladies animales ou humaines induites par les virus transmis par les tiques sont généralement graves, et présentent des signes cliniques suffisamment reconnaissables pour ne pas passer inaperçu (Labuda and Nuttall, 2004). Or, outre les cas de Peste Porcine Africaine reportés dans les années 1970s, aucun cas de maladie virale associée aux tiques n'a été rapportée dans les Caraïbes (Costard *et al.*, 2009 ; Gondard *et al.*, 2017). En l'absence de maladie, il est en général peu probable de détecter la présence d'un pathogène dans un vecteur.

Les nouveaux virus identifiés en NGS ont tous été retrouvés au sein de nos échantillons de tiques, et ont présenté des taux d'infection variables selon l'espèce de tiques analysée. Cependant, le fait que les deux espèces de tiques aient été collectées gorgées, et parfois sur le même animal, complique l'interprétation de nos résultats.

Par exemple, le CTVL présente un taux d'infection de 21,4% dans les *Amblyomma variegatum* de Guadeloupe. Certaines de ces tiques positives ont été collectées sur un animal qui a également servi à la collecte de tiques *Rhipicephalus microplus* positives. Sachant que les deux espèces de tiques se sont gorgées sur le même animal, la présence du CTVL au sein de l'échantillon de *Rhipicephalus microplus* semble d'avantage correspondre à une simple contamination du repas sanguin. L'absence de détection du CTVL dans les échantillons de *Rhipicephalus microplus* de Martinique renforce l'idée d'une certaine spécificité vectorielle du CTVL pour les tiques *Amblyomma variegatum*. De plus, comme cela a été étudié en Chapitre 1 de ce manuscrit, le CTVL est phylogénétiquement proche du Changping Tick Virus 2. Or ce virus a été décrit dans des échantillons de tiques *Dermacentor* spp. en Chine, et non dans les tiques *Rhipicephalus microplus* également collectées dans cette étude (Li *et al.*, 2015).

De façon similaire, on constate un taux d'infection très différent du JVL entre les deux espèces de tiques. Le JVL semble être largement distribué dans les tiques *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et de Martinique. Les échantillons *Amblyomma variegatum* positifs provenaient également d'animaux qui avaient servis à la collecte des tiques *Rhipicephalus*



*microplus* positives. Ainsi, ces résultats peuvent suggérer que le JVL infecte préférentiellement les *Rhipicephalus microplus*, et que sa présence dans les *Amblyomma variegatum* pourrait être synonyme de contamination du repas sanguin par ce virus, les deux espèces de tiques se nourrissant sur le même hôte. De plus, le JVL est phylogénétiquement proche du Mogiana tick virus et du Jingmen tick virus, tous deux décrits au Brésil et en Chine dans des tiques *Rhipicephalus microplus*, ce qui suggère une forte association entre les Jingmen virus et cette espèce de tique (Maruyama *et al.*, 2014 ; Qin *et al.*, 2014 ; Villa *et al.*, 2017).

Par contre, bien que le WTVL et le LTVL présentent des taux d'infection plus élevés chez les *Rhipicephalus microplus*, ces deux virus semblent pouvoir infecter les deux espèces de tiques. Le WTV a été détecté dans 14,6% des *Amblyomma variegatum* et dans 63,9% et 92,5% des *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et de Martinique. Des taux d'infections similaires ont été retrouvés pour le LTV. Ces résultats suggèrent d'avantage la capacité de ces deux virus à infecter les deux espèces de tiques, plutôt qu'une contamination des *Amblyomma variegatum* via des *Rhipicephalus microplus* infectées se nourrissant sur le même hôte. Toutefois au vu des taux d'infection, les virus semblent pouvoir infecter plus efficacement les *Rhipicephalus microplus*. Le WTVL et le LTVL sont respectivement proches du Wuhan tick virus 2 et du Lihan tick virus, décrits tous deux dans des échantillons de *Rhipicephalus microplus* en Chine, ce qui renforce l'idée d'une affinité marquée de ces virus pour cette espèce de tique (Li *et al.*, 2015).

En conclusion, ces quatre nouveaux virus semblent présenter des préférences de vecteurs. Toutefois, en regard du biais de détection lié à la présence de sang de l'hôte dans les tiques analysées, seules des études plus approfondies pourront permettre de confirmer ces résultats. Outre les études de compétence vectorielle nécessaire à l'identification formelle d'une espèce de tique vectrice, l'analyse de tiques non gorgées, ou l'analyse ciblée d'organes de la tique, telles que les glandes salivaires, permettraient dans un premier temps d'éviter la présence du sang de l'hôte mammifère potentiellement contaminant et ainsi nous permettrait de contourner le biais de détection.

De plus, si l'hypothèse d'une contamination via le repas sanguin d'une des deux espèces de tiques, qui ne serait pas vectrice, se confirme, cela signifie que le virus circule à un moment donné dans le sang du bovin. Ceci pourrait donc suggérer que (1) le virus serait capable de se répliquer chez le vertébré, qui une fois devenu virémique, transmettrait l'infection à la tique lors du repas sanguin, et/ou (2) le virus serait transmis par « co-feeding », une tique infectée transférerait le virus à une autre tique non infectée qui se nourrirait à

proximité via le site de gorgement, sans que l'hôte vertébré ne développe de virémie (Kazimírová *et al.*, 2017). Les Chuvirus, la nouvelle famille de virus à ARN circulaire décrit par Li *et al.*, 2015 et qui inclut le WTVL et CTVL, n'ont pour l'instant été décrits que dans des échantillons de tiques. Par contre, le JVL fait partie du nouveau groupe des Jingmenvirus, dont un membre a été récemment décrit chez un primate en Uganda (Ladner *et al.*, 2016 ; Villa *et al.*, 2017). De même le LTVL décrit comme un *Phlebovirus*, fait partie d'une famille virale dont certains membres infectent les vertébrés, et dont certains sont même pathogènes pour l'homme (Palacios *et al.*, 2013). Ainsi, il serait particulièrement intéressant de rechercher ces virus dans le sang de vertébrés, notamment des bovins des Antilles Françaises. Cela permettrait d'une part de déterminer si ces virus sont capables de se répliquer chez les vertébrés, et d'autre part d'identifier de potentiels hôtes réservoirs. La technique de LIPS (Luciferase Immunoprecipitation Systems) récemment décrite permet de réaliser un criblage immunologique personnalisé à l'aide de protéines recombinantes intégrant un fragment de séquence codante utilisé comme antigène associé à de la luciférase (Burbelo *et al.*, 2015). Sachant que nous possédons les séquences génomiques de ces nouveaux virus, cette méthode serait tout à fait indiquée pour le criblage de ces virus au sein d'échantillons de sang de bovin.

Finalement, la détection, bien que ponctuelle ou tardive, de ces quatre nouveaux virus au sein des échantillons d'ADN de tiques de Guadeloupe et de Martinique soulève la possible nature endogène de ces virus. A ce stade, sachant que les échantillons d'ADN n'ont pas subi de traitement à la RNase, on ne peut pas exclure une contamination en ARN des échantillons. Ainsi, soit les virus détectés en NGS peuvent présenter des séquences génomiques intégrées au génome de la tique, soit les amplifications sont dues à la présence de contamination en ARN des échantillons.

Bien que les séquences virales endogènes soient généralement décrites comme des pseudogènes non fonctionnels ou de l'ADN fossile, certains EVEs codent des ORF intacts, capables d'être exprimés (Katzourakis and Gifford, 2010). Ceci peut être lié soit à une endogénéisation récente du génome viral dans le génome hôte, soit à une exaptation (sélection positive) de l'EVE, au cours de l'évolution du génome hôte (Katzourakis and Gifford, 2010). Ainsi, sachant que nous avons obtenu des séquences ORF complètes pour chacun des nouveaux virus décrits en NGS, si ces virus présentent des formes endogènes, cela induirait soit une intégration virale récente, soit une sélection et un rôle biologique potentiel de ces séquences virales actives au sein du génome de la tique. Afin de déterminer clairement si ces nouveaux virus sont bien capables de former des particules virales ou si ce sont des EVEs, il faudrait tenter de les isoler. Une culture de ces virus à l'aide de lignée cellulaire de tique issue

de spécimens *Amblyomma variegatum* ou *Rhipicephalus microplus* permettrait ainsi d'isoler les virus, d'étudier leur structure, et de confirmer les génomes viraux obtenus en NGS.

Pour conclure, le criblage des arbovirus au sein des tiques de Guadeloupe et de Martinique à l'aide de la PCR microfluidique en temps réel a permis d'une part de confirmer l'absence de virus d'intérêt sanitaire transmis par les tiques dans les Antilles Françaises, et d'autre part d'analyser le taux d'infection des quatre nouveaux virus associés aux tiques *Rhipicephalus microplus* et *Amblyomma variegatum*. Nous avons pu démontrer que ces nouveaux virus sont largement distribués au sein des tiques des Antilles Françaises, présentant des taux d'infection parfois très élevés. Isoler ces virus devrait permettre de s'assurer d'une part du caractère exogène de ces virus, et d'autre part d'étudier la capacité de ces virus à se répliquer (ou non) chez les vertébrés et à être (ou non) pathogènes. Outre l'intérêt sanitaire de ces virus, à l'instar des bactéries endosymbiotiques, ces virus semblent faire partie du microbiome de la tique, et pourrait donc avoir un l'impact sur la biologie de la tique et sur sa capacité à transmettre des agents pathogènes (Narasimhan and Fikrig 2015). Caractériser les interactions entre ces virus et leurs vecteurs permettrait éventuellement de trouver de nouvelles pistes de contrôle des maladies à tiques transmis par *Rhipicephalus microplus* et *Amblyomma variegatum*.



## Développement de la PCR microfluidique en temps réel « Arbovirus » et criblage des arbovirus dans les tiques des Antilles Françaises

### ➤ Panel de détection : 31 Arbovirus

- Virus d'intérêt sanitaire transmis par les tiques : les virus de la fièvre porcine africaine (African swine fever), de la Fièvre à tiques du Colorado (Colorado tick fever), de la Maladie de la forêt de Kyasanur (Kyasanur forest disease), de la Fièvre hémorragique de Crimée-Congo (Crimean-Congo Hemorrhagic fever), de la Fièvre hémorragique de Omsk (Omsk Hemorrhagic fever), de l'Encéphalite à tique (Tick-borne encephalitis, sous-type Europe, Extrême-Orient, Sibérie), du syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopénie (Severe fever with thrombocytopenia syndrome), le Eyach, Dugbe, Uukuniemi, Schmallenberg, Louping ill, Langat, Deer tick, Powassan, West Nile, Meaban, Thogoto, Dhori, Kemerovo, Bourbon, et le Heartland.
- Virus d'intérêt sanitaire transmis par le moustique, endémique/épidémique dans les Antilles Françaises : la Dengue, le Zika, et le Chikungunya
- Virus identifiés en NGS dans les tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et de Martinique : le Changping tick virus-like, Wuhan tick virus-like, Lihan tick virus-like, Jingmenvirus-like.

### ➤ Arbovirus d'intérêt médical ou vétérinaire non détectés.

### ➤ Détection des quatre virus identifiés en séquençage Illumina

- Virus détectés dans les échantillons d'ADNc des *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et de Martinique : spécificité de vecteur probable pour le Changping tick virus-like (*Amblyomma variegatum*) et le Jingmenvirus-Like (*Rhipicephalus microplus*).
- Virus détectés dans les échantillons d'ADN de tique : Endogénéisation potentielle des virus dans le génome de la tique (*Rhipicephalus microplus*).

### ➤ Perspectives

Isolement des virus ? Virus endogène et/ou exogène ?

Circulation des virus chez les vertébrés ?

Impact des virus sur la biologie de la tique ? Sur la transmission des agents pathogènes ?

# **CHAPITRE 3**

**Collecte de tiques dans les Caraïbes  
Etudes épidémiologiques exploratoires**

## **1. Introduction**

L'outil de détection à haut débit (PCR microfluidique en temps réel) que nous venons de développer est adapté aux criblages à large échelle des agents pathogènes transmis par les tiques dans la zone étendue des Caraïbes.

L'échantillonnage de tiques collectées en Guadeloupe et Martinique sur bovin nous a permis de valider notre outil de dépistage. Cependant la nature même de l'échantillonnage a restreint le biotope analysé. En effet, seulement deux espèces de tiques ont été collectées et analysées, provenant de deux îles seulement, et toutes échantillonnées sur bovins. Le biais d'échantillonnage engendré a probablement limité la diversité en agents pathogènes détectables à ceux incluant l'hôte bovin et les tiques associées au bétail dans leur cycle de vie.

Nous avons donc cherché à étendre notre recherche d'agents pathogènes transmis par les tiques à d'autres îles des Caraïbes, et à diversifier notre échantillonnage en tentant de collecter d'autres espèces de tiques, impliquant d'autres types d'hôte vertébrés que le bovin. Pour cela, au cours de mon année passée en Guadeloupe auprès du CIRAD, nous avons organisé un appel à participation auprès des services vétérinaires, locaux en Guadeloupe, et Caribéens via le réseau international CaribVet. L'objectif était de récolter un maximum d'échantillons de tique à travers la Caraïbe, afin de réaliser une étude épidémiologique exploratoire des agents pathogènes transmis par les tiques caribéennes à l'aide de notre outil de détection à haut débit.

## **2. Matériel et Méthode :**

### **2.1. Organisation de la collecte de tiques en Guadeloupe**

En Guadeloupe, nous souhaitons compléter notre étude de criblage des agents pathogènes transmis par les tiques en collectant des spécimens prélevés sur des hôtes vertébrés autres que les bovins, par exemple sur chiens, chats, chèvres, chevaux, etc.... Nous avons donc décidé de lancer un appel à participation auprès des vétérinaires locaux afin de récupérer un maximum de tiques, soit lors de rendez-vous médicaux en clinique (chiens, chats), soit au cours de visite à domicile chez des éleveurs (chevaux, chèvres, etc...). Nous avons en premier lieu pris contact avec la DAAF (Direction de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt) afin de leur expliquer notre projet de recherche et notre volonté d'entrer en

contact avec les vétérinaires de Guadeloupe afin de récupérer des échantillons de tiques à travers l'île. La DAAF a ainsi donné son accord, et a diffusé notre appel à participation sur la liste de diffusion des vétérinaires de Guadeloupe. L'appel à participation se composait de:

- Prospectus d'appel à participation (Figure 1) : le prospectus devait être simple, attractif et rassembler de façon concise les informations principales relatives au projet. Il s'agissait de nous faire connaître, d'expliquer le contexte ainsi que les objectifs de l'étude, et le type d'échantillonnage attendu, et les conditions de conservations des échantillons.
- Questionnaire épidémiologique (Figure 2) : le questionnaire épidémiologique devait être associé à chaque collecte de tiques, quel que soit l'animal prélevé. Nous avons essayé de rendre le questionnaire le plus simple possible afin de ne pas dissuader les bénévoles, en demandant les renseignements qui semblaient les plus importants, tels que l'origine de l'animal hôte, sa nature, sa localisation, le nom des propriétaires, le nombre de tiques collectées par animal. Nous avons également demandé aux vétérinaires de renseigner le niveau d'infestation de l'animal par les tiques, la réalisation ou non de traitement anti-acaricide, la présence ou non d'un historique médical lié à une maladie à tique. Enfin, si cela était possible, d'identifier les tiques collectées.
- Présentation plus détaillée du projet de recherche (Figure 3): j'avais mis à disposition des vétérinaires un diaporama qui expliquait plus en détails le projet de thèse pour ceux qui souhaitaient plus d'informations.

Parmi les vétérinaires inclus dans la liste de diffusion de la DAAF, seulement quatre vétérinaires ont répondu favorablement à notre appel : Jolt Evva (Clinique de St Rose), Gilles Manuel (Clinique de Basse-Terre), Jon Cherdieu (Clinique de Lamentin), Xavier Roy (Clinique de Baie Mahault). Je me suis rendue dans chacune des cliniques bénévoles afin d'une part de rencontrer les vétérinaires, et d'autre part de leur expliquer le processus de collecte et de conservation des échantillons. A cette occasion, je leur ai également distribué les tubes de collecte et les questionnaires épidémiologiques associés. Pour chaque animal prélevé, un maximum de 10 tiques pouvaient être collectées, puis les tiques devaient être placées à -80°C quand cela était possible ou à -20°C. Chaque collecte devait être accompagnée de son questionnaire épidémiologique afin d'assurer la traçabilité de l'échantillon. Enfin, en fonction du nombre de collectes réalisées par semaine, je devais passer environ tous les quinze jours récupérer les échantillons de tique prélevées, et redonner de nouveaux tubes de collecte, ainsi que des questionnaires.



CARIBBEAN ANIMAL  
HEALTH NETWORK



cirad  
LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
POUR LE DÉVELOPPEMENT



INRA  
SCIENCE & IMPACT

anses  
agence nationale de sécurité sanitaire  
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

## Projet DOMOTICK Protocole de collecte et de conservation d'échantillons de tiques



### Projet DOMOTICK:

"Découverte et détection des agents pathogènes transmis par les tiques dans les Caraïbes"

Afin de pouvoir valider pleinement le potentiel de détection de notre technologie nous sommes à la recherche de partenaires dans le milieu vétérinaire pour collecter des échantillons de tiques,

Objectifs de l'étude:

- Connaissances des agent pathogènes transmis par les tiques qui circulent en Guadeloupe et dans les caraïbes.
- Développement et validation d'une technologie adaptée à des études de surveillance épidémiologique à grande échelle.



Détection simultanée de 46 à 96 agents pathogènes dans 46 à 96 échantillons biologiques



### Collecte des tiques + Questionnaire épidémiologique:

Stratégies d'échantillonnage des tiques :

Collecte de tiques sur animaux de la ferme (hors bovins\*) et animaux domestiques

→ Aucune limite de nombre de tiques à collecter: le maximum c'est le mieux!

Un questionnaire épidémiologique accompagnera la collecte (coordonnées GPS des sites de collecte nécessaires).



### Collection et préservation:

Un tube de collecte par animal prélevé. Les tubes seront fournis, et devront être étiquetés (date, lieu de la collecte, numéro animal). Les tiques doivent être transportées vivantes à température ambiante jusqu'au cabinet ou au laboratoire. Là, les tiques doivent être congelées rapidement à -80°C (ou au moins à -20°C).



### Tiques collectées + Questionnaire rempli → contacter le CIRAD:

- Responsable du projet:  
Emmanuel Albina: mail: [Emmanuel.albina@cirad.fr](mailto:Emmanuel.albina@cirad.fr) / téléphone: +590 590 25 54 44
- Doctorante en charge du projet:  
Mathilde Gondard: mail: [mathilde.gondard@cirad.fr](mailto:mathilde.gondard@cirad.fr)

(\*) Collecte de tique sur bovins déjà réalisée en Guadeloupe et en Martinique.

Figure 7. Appel à coopération diffusé auprès de la liste des vétérinaires cliniciens de Guadeloupe, via la DAAF.





CARIBBEAN ANIMAL  
HEALTH NETWORK



### Questionnaire épidémiologique Projet DOMOTICK

Date de la collecte : ...../...../.....

Identification du préleveur :

Nom : ..... / Numéro/fax : .....

Identification éleveur :

Nom : ..... / Code élevage: .....

Site de collecte :

Adresse : .....

GPS lat/long : ..... / .....

Contexte de la visite : (cocher la case)

Surveillance active *Amblyomma variegatum* (tique sénégalaise) ☐

Cas clinique ☐

Projet DOMOTICK ☐

Autre : ..... ☐

Taille du troupeau (Si collecte de tiques sur animaux d'élevage): .....

Informations		Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
Espèce hôte	Espèce				
	Code identification				
Type élevage	Libre Piquet				
	Pâturage				
	Stabulation/ box d'engraissement				
Historique médical maladie à tique	Oui				
	Non				
Si oui	Nom de la maladie				
	De quand date-t-elle? (≤ ou ≥ 1 an)				
	Symptômes				
Niveau infestation par les tiques	Faible (≤5 tiques)				
	Modéré (entre 6 et 15 tiques)				
	Elevé (≥16 tique)				
Traitement acaricide	Occasionnel (≤ 4 traitements/an)				
	Régulier (≥ 5 traitements/an)				
Acaricide utilisé	Taktic				
	Bayticol				
	Butox				
	Sebacyl				
	Other				
Tique collectée	Nombre de tique				
	Espèce de tique				
	Nombre d'Adulte				
	Nombre de nymphe				

Figure 8. Questionnaire épidémiologique distribué au vétérinaire bénévole, devant être associé à chaque collecte de tique.

## Projet DOMOTICK

Virus?

Bactéries?

Parasites?

**Détection des agents pathogènes transmis par les tiques dans la zone des Caraïbes**  
**Etude épidémiologique exploratoire**

Mathilde Gondard  
Etudiante en thèse, Université de Paris-Est Créteil Val-de-Marne, Ecole Doctorale ABIES

**Superviseurs:**

- Muriel Vaysier-Tausat and Sara Moutailler  
Laboratoire de Santé Animale de Maisons Alfort, UMR BIPAR, Equipe Vectoq
- Emmanuel Albina  
UMR CIRAD/INRA « Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes » (CMAEE), Equipe Virologie, Guadeloupe.

## Projet DOMOTICK

**Quels sont les Agents pathogènes recherchés?**

Analyse de la littérature scientifique:

Sélection des agents pathogènes transmis par les tiques dans la zone tropicale des Amériques (Amérique du Nord, Amérique Latine et les Caraïbes)

## Projet DOMOTICK

**Quels sont les Agents pathogènes recherchés?** **40 Bactéries:**

❖ *Anaplasma* spp:  
*Anaplasma marginale*  
*Anaplasma phagocytophilum*  
*Anaplasma platys*  
*Anaplasma bovis*  
*Anaplasma ovis*

❖ *Ehrlichia* spp:  
*Ehrlichia canis*  
*Ehrlichia chaffeensis*  
*Ehrlichia ewingii*  
*Ehrlichia ruminantium*  
*Panola mountain Ehrlichia*

❖ *Neoehrlichia mikurensis*

❖ *Bartonella* spp:  
*Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii*  
*Bartonella bacilliformis*  
*Bartonella henselae*

❖ *Borrelia* spp:  
*Borrelia anserina*  
*Borrelia lonestari*  
*Borrelia parkeri*  
*Borrelia turicatae*  
*Borrelia theileri*  
*Borrelia bissettii*  
*Borrelia burgdorferi*

## Projet DOMOTICK

**Quels sont les Agents pathogènes recherchés?** **40 Bactéries:**

❖ *Rickettsia* spp:  
*Rickettsia typhi*  
*Rickettsia prowazekii*  
*Rickettsia parkeri*  
*Rickettsia felis*  
*Rickettsia akari*  
*Rickettsia africae*  
*Rickettsia massiliae*  
*Rickettsia rickettsii*

❖ *Francisella tularensis*  
❖ *Coxiella burnetii*  
❖ *Aegyptianella*

❖ *Mycoplasma* spp:  
*Mycoplasma ovis*  
*Mycoplasma haemocanis (Hemoplasma canis)*  
*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*  
*Mycoplasma haemofelis (hemoplasma felis)*  
*Candidatus Mycoplasma haemominutum*  
*Candidatus Mycoplasma turicensis*  
*Mycoplasma suis (Hemoplasma suis)*  
*Mycoplasma wenyonii*

## Projet DOMOTICK

**Quels sont les Agents pathogènes recherchés?** **14 Parasites:**

❖ *Babesia* spp:  
*Babesia gibsoni*  
*Babesia bigemina*  
*Babesia bovis*  
*Babesia caballi*  
*Babesia canis vogeli*  
*Babesia duncani*  
*Babesia microti*  
*Babesia ovis*

❖ *Theileria* spp  
*Theileria equi*

❖ *Hepatozoon* spp:  
*Hepatozoon canis*  
*Hepatozoon americanum*

❖ *Leishmania* spp:  
*Leishmania infantum*

❖ *Rangella vitalii*

❖ *Cytauxzoon felis*

## Projet DOMOTICK

**Quels sont les Agents pathogènes recherchés?** **25 Arbovirus**

Bunyaviridae

- ❖ Orthobunyavirus
- Schmallenberg virus

❖ Phlebovirus

- Heartland virus
- Severe-fever-with-thrombocytopenia-syndrome virus
- Uukuniemi virus

❖ Nairovirus

- Crimean congo Hemoragic fever virus
- Dugbe virus
- Nairobi sheep disease virus

Asfarviridae

- ❖ Asfivirus
- African swine fever virus

Orthomyxoviridae

- ❖ Thogotovirus
- Dhori virus
- Thogoto Virus
- Bourbon virus

## Projet DOMOTICK

**Quels sont les Agents pathogènes recherchés?** **25 Arbovirus**

Flaviviridae

- ❖ Flavivirus:
- Deer tick virus
- Powassan virus
- Kyasanur virus
- Langat virus
- Louping ill virus
- Meaban virus
- Omsk virus
- West nile virus
- Tick borne encephalitis virus (TBE) (Europe/far eastern/Siberian)

Reoviridae

- ❖ Coltivirus
- Eyach virus
- Colorado tick fever virus

❖ Orbivirus

- Kemerovo virus

## Projet DOMOTICK

**Quelle est la technique de détection développée ?**

QPCR micro-fluidique à haut débit  
BioMark™ dynamic arrays (Fluidigm Corporation)

→ PCR en temps réel:  
Permet l'amplification et la détection des molécules d'ADN ou d'ARN spécifiques de chaque agents pathogènes recherchés

→ Le support micro-fluidic:  
La miniaturisation du support permet de réaliser de nombreuses réactions d'amplification simultanément

→ En une seule fois: détection de 46 à 96 agents pathogènes différents dans 46 à 96 échantillons biologiques

Figure 3. Présentation du projet de thèse (DOMOTICK) diffusé auprès de la liste des vétérinaires cliniciens de Guadeloupe, via la DAAF.

225

### Projet DOMOTICK

**Quelle est la technique de détection développée ?**

Le support micro-fluidic: 2304 à 9216 réactions de Q-PCR

Dépôt des réactifs permettant la détection spécifique des agents pathogènes



Dépôt des échantillons biologiques (ADN ou ARN extraits de tique)

Réaction d'amplification et de détection des agents pathogènes dans les échantillons biologiques

Fluidigm GENETIC ANALYTICS

anses cirad INRA

### Projet DOMOTICK

**Nécessité de collecter des échantillons de tiques des Caraïbes**

⇒ Validation de la technique de détection

⇒ Etude épidémiologique exploratoire

Quels sont les agents pathogènes transmis par les tiques qui circulent actuellement dans les Caraïbes?

anses cirad INRA

### Projet DOMOTICK

**Nécessité de collecter des échantillons de tiques des Caraïbes**



Guadeloupe et Martinique: Collecte de tiques sur bovin



Guadeloupe et Martinique: Collecte de tiques sur bovin

Réseau CaribVet: Collecte de tiques dans différentes îles des Caraïbes

Réseau Vétérinaire de Guadeloupe



anses cirad INRA

### Projet DOMOTICK

**Nécessité de collecter des échantillons de tiques des Caraïbes**

Réseau Vétérinaire de Guadeloupe



Nous cherchons des tiques collectées sur animaux tels que chiens, chat, cabris, chevaux ...

Protocole de collecte: Distribution des tubes de collection + questionnaire épidémiologique

Prélèvement:

- Un tube de collection par animal
- Au mieux 10 tiques par animal
- Choisir des tiques non ou peu gorgées, nymphes ou adultes.
- Congélation des tiques vivantes à -80°C (solution temporaire à -20°C)
- Le questionnaire épidémiologique doit accompagner chaque prélèvement

Récupération des échantillons en fonction de la capacité de stockage de chacun, et de la présence ou non d'un congélateur -80°C → L'idée est d'organiser une tournée de récupération des échantillons par le CIRAD environ tous les 15 jours.

anses cirad INRA

### Projet DOMOTICK







Merci à tous les volontaires !!

[mathilde.gondard@cirad.fr](mailto:mathilde.gondard@cirad.fr)

**Figure 3. Présentation du projet de thèse (DOMOTICK) diffusé auprès de la liste des vétérinaires cliniciens de Guadeloupe, via la DAAF (suite).**

## **2.2. Organisation de la collecte de tiques dans les Caraïbes**

Afin de récupérer des échantillons de tiques des Caraïbes, autre que les Antilles Françaises, nous avons lancé un appel à participation auprès du réseau Caribéen de Santé Animale (CaribVET). Ce réseau international, animé par le CIRAD, regroupe des acteurs du domaine de la santé animale de 34 territoires de la Caraïbe, incluant des services vétérinaires, laboratoires, instituts de recherche et organisations régionales et internationales (CARICOM), dont le but est d'améliorer la situation sanitaire et de contribuer à l'harmonisation et au renforcement de la surveillance et du contrôle des maladies animales dans la Caraïbe (<https://www.caribvet.net/>).

Le CIRAD de Guadeloupe, plus précisément le CRVC (centre de recherche et de veille sur les maladies vectorielles dans la Caraïbe) au sein duquel j'ai réalisé ma thèse, fait partie des membres du réseau. Jennifer Pradel, épidémiologiste au CIRAD et coordinatrice du réseau CaribVET nous a permis de diffuser notre appel à participation auprès des membres du réseau, notamment auprès du groupe de travail impliqué dans la gestion des tiques et des maladies à tique dans la région.

L'appel à participation se composait de :

- Présentation détaillée du projet de recherche en anglais (Figure 4), expliquant l'objectif de l'étude, la méthode à haut débit développée et son intérêt en termes de veille sanitaire à large échelle. Les partenaires étaient également invités à nous faire part de leurs suggestions quant à la liste des agents pathogènes à rechercher dans la région. En effet, la puce de détection à cette époque était en cours de développement, il y avait donc la possibilité d'ajouter de nouvelles cibles et de s'adapter aux recommandations des partenaires caribéens.
- Protocole de collecte et de conservation des échantillons de tiques en anglais (Figure 5), indiquant le type d'échantillons de tiques recherchés et la méthode de conservation la plus appropriée. A ce stade, nous ne savions pas encore dans quelle mesure les partenaires ciblés pouvaient organiser ou non une collecte de tique. Ainsi, on avait établi deux types d'échantillonnage. Un échantillonnage dit « structuré », réalisé en fonction de l'écosystème insulaire et des espèces hôtes ciblées, ou un échantillonnage dit « libre », dans le cas où la collecte ne suivait pas de règle d'échantillonnage précise, le but étant de récupérer un maximum d'échantillons de tiques. A l'exception de la limite de dix tiques maximum collectées par animal, l'échantillonnage n'avait pas de restrictions, et les tiques pouvaient être collectées sur

n'importe quel type d'hôte, bovin, équin, caprin, chien, chat, etc... Les tiques devaient être collectées vivantes, pas ou peu gorgées, et conservées à -80°C. Dans le cas où les partenaires ne bénéficiaient pas de congélateur à -80°C les tiques pouvaient être placées à -20°C.

- Questionnaire épidémiologique en anglais (Figure 6) : le questionnaire épidémiologique devait être associé à chaque collecte de tique. Un model général a été préparé, permettant d'obtenir les informations relatives au lieu de la collecte, aux nombre de tiques collectées, et à l'espèce hôte prélevée (animaux d'élevage, animaux domestique, et faune sauvage). De nouveau, nous avons essayé de rendre le questionnaire le plus simple possible afin de ne pas dissuader les partenaires.

Parmi les membres du réseau CaribVET contactés, 10 pays/territoires ont montré de l'intérêt pour l'étude et ont souhaité participer au projet (Tableau 1).

**Tableau 3: Membres du réseau CaribVET souhaitant participer à la collecte de tique.**

<b>Pays/Territoire</b>	<b>Partenaires/ contact</b>	<b>Adresse</b>
<b>Les îles vierges (USA)</b>	Bethany Bradford	Department of Agriculture RR1 Box 10345, Kingshill 00850 Virgin Islands, U.S.
<b>Barbade</b>	Mark Trotman	Veterinary Services Ministry of Agriculture, Food, Fisheries and Water Resource Management The Pine Blvd The Pine, St. Michael Barbados, W.I.
	David A. Elcock	
<b>Aruba</b>	Irenes Croes	Veterinary Service of Aruba Barcadera 1 Aruba, Dutch Caribbean
<b>Trinidad et tobago</b>	Karla Georges	Faculty of Medical Sciences The University of the West Indies Eric Williams Medical Sciences Complex Mt. Hope Trinidad
	Roxanne A. Charles	
<b>St Lucie</b>	Roxanne A. Charles	
<b>Haiti</b>	Harry Charles	Veterinary specialist, Heifer International Haiti 59 Rue Tossaint Louverture Les Cayes, Haiti
<b>St Eustache</b>	Sharon N. Veira	Veterinarian, Department of Agriculture, St Eustatius
<b>Cuba</b>	María T. Frías Lepoureau	CENSA Center for Animal and Plant Health Cuba
	Pastor Alfonso	
<b>Belize</b>	Isabelle Paquet-Durand	Belize Wildlife and Referral Clinic (BWRC), Belizean non-profit organization
	Miguel Figueroa	
<b>St Kitts</b>	Jennifer ketzis	Ross University, Main Street Basseterre, St. Kitts



Une fois la collecte effectuée et selon le nombre de tiques collectées, nous avons envoyé aux différents partenaires du RNALater (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Ce réactif est un conservateur qui permet d'éviter la dégradation des acides nucléiques durant le transport d'échantillons biologiques à température ambiante. Ensuite les échantillons placés dans du RNALater devaient être rapatriés au CRVC de Guadeloupe afin de procéder à l'extraction des ADN/ARN des tiques collectées.

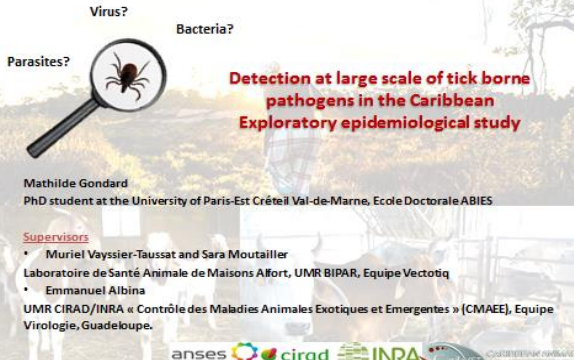

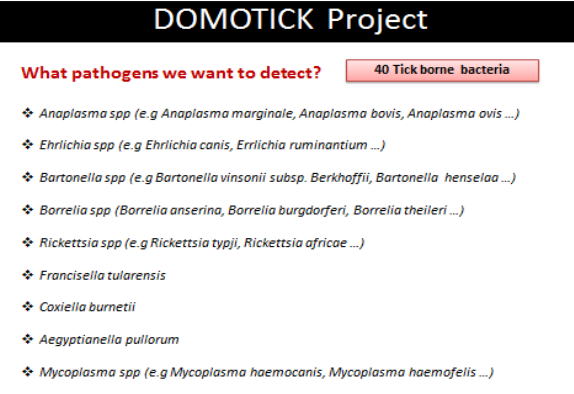

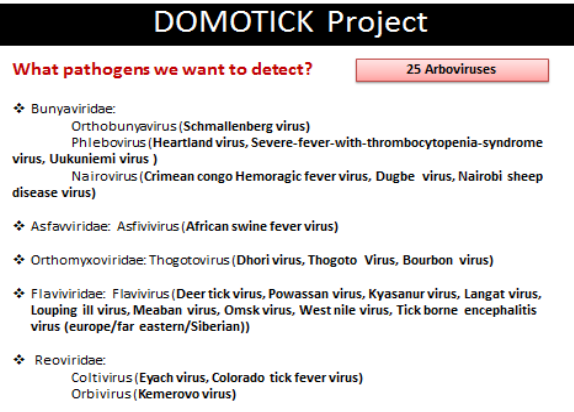
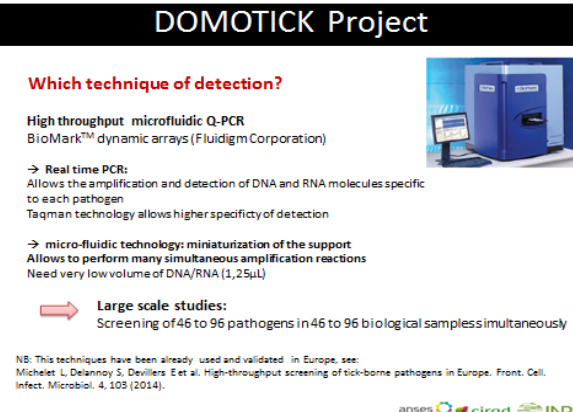
DOMOTICK Project	DOMOTICK Project
 <p><b>DOMOTICK Project</b></p> <p>Virus? Bacteria? Parasites?</p> <p><b>Detection at large scale of tick borne pathogens in the Caribbean</b> <b>Exploratory epidemiological study</b></p> <p>Mathilde Gondard PhD student at the University of Paris-Est Créteil Val-de-Marne, Ecole Doctorale ABIES</p> <p><b>Supervisors:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Muriel Vayssier-Tausat and Sara Moutailler Laboratoire de Santé Animale de Maisons Alfort, UMR BIPAR, Equipe Vectoq</li> <li>Emmanuel Albina UMR CIRAD/INRA « Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes » (CMAEE), Equipe Virologie, Guadeloupe.</li> </ul> <p>anses cirad INRA</p>	 <p><b>DOMOTICK Project</b></p> <p><b>What pathogens we want to detect?</b></p> <p>Bibliographical research: Selection of tick borne pathogens of veterinary and public health importance, detected in the Americas (Nord America, Latin America and Caribbean)</p> <p>Map of the Americas showing the study area.</p>
 <p><b>DOMOTICK Project</b></p> <p><b>What pathogens we want to detect?</b> 40 Tick borne bacteria</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Anaplasma spp (e.g Anaplasma marginale, Anaplasma bovis, Anaplasma ovis ...)</li> <li>Ehrlichia spp (e.g Ehrlichia canis, Errlichia ruminantium ...)</li> <li>Bartonella spp (e.g Bartonella vinsonii subsp. Berkhoffii, Bartonella henselae ...)</li> <li>Borrelia spp (Borrelia anserina, Borrelia burgdorferi, Borrelia theileri ...)</li> <li>Rickettsia spp (e.g Rickettsia typhi, Rickettsia africae ...)</li> <li>Francisella tularensis</li> <li>Coxiella burnetii</li> <li>Aegyptianella pullorum</li> <li>Mycoplasma spp (e.g Mycoplasma haemocanis, Mycoplasma haemofelis ...)</li> </ul>	 <p><b>DOMOTICK Project</b></p> <p><b>What pathogens we want to detect?</b> 14 Tick borne parasites</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Babesia spp (e.g Babesia gibsoni, Babesia bigemina, Babesia bovis ...)</li> <li>Theileria spp (Theileria equi)</li> <li>Hepatozoon spp (Hepatozoon canis, Hepatozoon americanum)</li> <li>Leishmania spp (Leishmania infantum)</li> <li>Rangelia vitalii</li> <li>Cytauxzoon felis</li> </ul>
 <p><b>DOMOTICK Project</b></p> <p><b>What pathogens we want to detect?</b> 25 Arboviruses</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Bunyaviridae: Orthobunyavirus (Schmallenberg virus), Phlebovirus (Heartland virus, Severe-fever-with-thrombocytopenia-syndrome virus, Uukuniemi virus), Nairovirus (Crimean congo Hemoragic fever virus, Dugbe virus, Nairobi sheep disease virus)</li> <li>Asfaviridae: Asfivirus (African swine fever virus)</li> <li>Orthomyxoviridae: Thogotovirus (Dhori virus, Thogoto Virus, Bourbon virus)</li> <li>Flaviviridae: Flavivirus (Deer tick virus, Powassan virus, Kyasanur virus, Langat virus, Louping ill virus, Meaban virus, Omsk virus, West Nile virus, Tick borne encephalitis virus (Europe/far eastern/Siberian))</li> <li>Reoviridae: Coltivirus (Eyach virus, Colorado tick fever virus), Orbivirus (Kemerovo virus)</li> </ul>	 <p><b>DOMOTICK Project</b></p> <p><b>Which technique of detection?</b></p> <p>High throughput microfluidic Q-PCR BioMark™ dynamic arrays (Fluidigm Corporation)</p> <p>→ Real time PCR: Allows the amplification and detection of DNA and RNA molecules specific to each pathogen Taqman technology allows higher specificity of detection</p> <p>→ micro-fluidic technology: miniaturization of the support Allows to perform many simultaneous amplification reactions Need very low volume of DNA/RNA (1,25µL)</p> <p>→ Large scale studies: Screening of 46 to 96 pathogens in 46 to 96 biological samples simultaneously</p> <p>NB: This techniques have been already used and validated in Europe, see: Michelet L, Delannoy S, Desillers E et al. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. Front. Cell. Infect. Microbiol. 4, 105 (2014).</p> <p>anses cirad INRA</p>

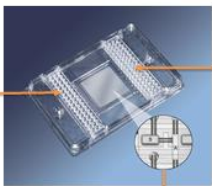
Figure 4. Présentation du projet de thèse (DOMOTICK) diffusé auprès des membres du réseau CaribVET.

### DOMOTICK Project

**Which technique of detection?**

2 sizes of chip: 46x46 or 96x96  
High throughput microfluidic Q-PCR: 2304 to 9216 QPCR reactions

Reagents allowing specific detection of pathogens (Probes and Primers)



Biological samples (In this project, DNA and RNA extracted from ticks)

Amplification reactions, detection of pathogens

Fluidigm  
GENETIC ANALYSIS

anses cirad INRA

### DOMOTICK Project

**Requirement of tick samples collected through the Caribbean**

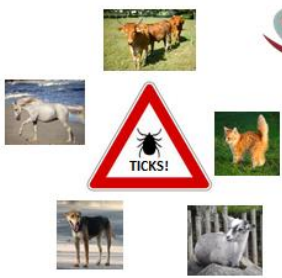
➡ Validation of the detection tool

➡ Exploratory epidemiological study:  
Which tick borne pathogens actually circulate in the Caribbean?

anses cirad INRA

### DOMOTICK Project

**Requirement of tick samples collected through the Caribbean**



+ Local Veterinarian network, research projects...

Sampling of ticks in the tropical zone of the Caribbean

Ticks collected from any kind of vertebrate hosts

CaribVET  
CARIBBEAN ANIMAL HEALTH NETWORK

anses cirad INRA

### DOMOTICK Project

**Requirement of tick samples collected through the Caribbean**

Ticks collected from any kind of vertebrate hosts (cattle, horses, dogs, cats, sheep, goats...)

Collection Protocol : Sampling + Epidemiological questionnaire

- One tube collection tube/ animal
- No limitation for the number of ticks: at least, 10 ticks/ animal if possible
- Selection of no or few engorged ticks (nymphs, adults)
- Freezing of the alive ticks at -80°C
- The epidemiological questionnaire need to be associated to each collection


Sample shipment:

When all ticks will have been collected contact CIRAD  
by email: [Emmanuel.albina@cirad.fr](mailto:Emmanuel.albina@cirad.fr); [mathilde.gondard@cirad.fr](mailto:mathilde.gondard@cirad.fr)  
Or by phone: +590 590 25 54 44

For the shipping of ticks, we will first send to you by Fedex, collection tubes with RNA preservative. Then, you will have to put the ticks in these collection tubes. When achieved, we will order Fedex to come to your laboratory and retrieve the parcel at our own expenses. Import permit will be issued by ourselves and sent to you before shipping

anses cirad INRA

### DOMOTICK Project



Thank you for your collaboration!!

[Emmanuel.albina@cirad.fr](mailto:Emmanuel.albina@cirad.fr); [mathilde.gondard@cirad.fr](mailto:mathilde.gondard@cirad.fr)

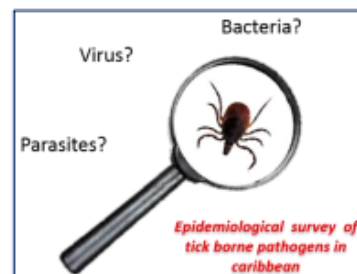
**Figure 4. Présentation du projet de thèse (DOMOTICK) diffusé auprès des membres du réseau CaribVET (suite).**

## Protocol for the Collection and Conservation of ticks for epidemiological studies

### Domotick project:

"Discovering, detecting pathogens in Caribbean Ticks"

- Collecting ticks in order to conduct large epidemiological surveys of tick borne pathogens in Caribbean.



At the moment, only ticks from Guadeloupe and Martinique have been collected.

However, the high-throughput micro-fluidic detection system developed in this project can handle many more tick samples.

In this aim, CIRAD is seeking a partnership through the CaribVet network, to develop this project. Outcomes of the project will be a better knowledge of the distribution of tick-associated pathogens in the Caribbean, and improvement of protocols for surveillance and control of diseases transmitted by ticks.

### Sampling strategies:

Basically, there is no limitation on the number of ticks to collect: the maximum, the better.

#### Case 1: Possibility of collecting ticks according to the ecosystem and the host species.

- Random selection of sites in each landscape class and for each farm animals  
When collecting on farm animals, 30 ticks are needed by collecting site, with a maximum of 10 ticks by animal recommended.

#### Case 2: No sampling strategy

- Collecting ticks in different places, feeding on cattle or any other kind of animals, for example equines and dogs, all development stages, males and females, engorged or not.

The sites of collection should be georeferenced or at least, the detailed location should be recorded. An epidemiological questionnaire was established and must be completed during collection ticks.

### Collection and preservation:

One collection tube per animal. Ticks should be transported alive at ambient temperature from the field to the laboratory. In the laboratory, the ticks should be stored in labeled tubes (date and place of collection), and frozen immediately, preferentially at -80°C, or alternatively at -20°C.

When all ticks will have been collected contact CIRAD:

by email: [Emmanuel.albina@cirad.fr](mailto:Emmanuel.albina@cirad.fr)

Or by phone: +590 590 25 54 44

Figure 5. Protocole d'échantillonnage et de conservation des échantillons de tiques envoyé aux membres du réseau CaribVET.





CARIBBEAN ANIMAL  
HEALTH NETWORK



### Epidemiological survey

(\*) Date of tick and data collection : ...../...../.....

(\*) : Required fields

**Person in charge of the collection :**

First and Last Name : .....

Phone number/Fax : .....

(\*) Animals owner :

First and Last Name : .....

Farmer code : .....

Address : .....

.....

(\*) GPS lat/long : ..... / .....

Or

(\*) Slaughterhouse facilities:

Identification : .....

Address : .....

.....

(\*) GPS lat/long : ..... / .....

(\*) Number of farm animals :

Bovine : .....

Caprine : .....

Ovine : .....

Poultry : .....

Pig : .....

Equines : .....

(\*) Number of other animals :

Cat : .....

Dog : .....

**Sampling ecosystem : (tick corresponding boxes)**

Rural : Cultures ☐

Pastures ☐

Urban : High population density ☐

Low population density ☐

Nature (e.g. Tropical forest ) ☐

Other : ..... ☐

**Purpose of the visit : (tick corresponding boxes)**

Active surveillance of *Amblyomma variegatum* (senegalese tick) ☐

Clinical surveillance (Animal health issues) ☐

Domotik project ☐

Slaughterhouse survey (traceability to farm of origin ?)

- Localisation of the farm providing the animals : .....

- Geographical area from where the animals come (e.g. « Southwest ») : .....

Other : ..... ☐

Figure 6. Questionnaire épidémiologique envoyé aux partenaires du réseau CaribVET

**1) Ticks collected on farm animals:**

**Host (species) :** .....

**Animal management :** (tick corresponding boxes)

Intensive enclosed ☐

Tethered ☐

Pasture ☐

Roaming ☐

**(\*) Level of tick infestation :** (tick corresponding boxes)

Few ( $\leq 5$  ticks) ☐

Moderate (from 6 to 15 ticks) ☐

High ( $\geq 16$  ticks) ☐

No infestation ☐

**(\*) Tick borne disease record :** (tick corresponding boxes)

No ☐

Yes ☐

**If YES :** (tick corresponding boxes)

☐  $\leq 1$  year ago      ☐  $\geq 1$  year ago

When

Disease Name

Symptoms observed

**Acaricide Treatment :** (tick corresponding boxes)

No treatment ☐

Occasional treatment ( $\leq 4$  treatments/year) ☐

Regular treatment ( $\geq 5$  treatments/year) ☐

**Acaricide used :** (tick corresponding boxes)

Tactic ☐

Bayticol ☐

Butox ☐

Sebacyl ☐

Other : ☐

Animal*	Nb of ticks	Tick species	Nb of adult male	Nb of adult female	Nb of Nymph
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					

\* : One collection tube by animal ; (Nb : Number)

Figure 6. Questionnaire épidémiologique envoyé aux partenaires du réseau CaribVET (suite)

**2) Ticks collected on Domestic animals (dog, cat) :**

Host species ?

(\*) Tick borne disease record : (tick corresponding boxes)

No

☐

Yes

☐

If YES : (tick corresponding boxes)

☐

When

≤ 1 year ago

☐

≥ 1 year ago

Disease Name

.....

.....

Symptoms observed

.....

.....

Animal*	Nb of ticks	Tick species	Nb of adult male	Nb of adult female	Nb of Nymph
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

\* : One collection tube by animal ;(Nb : Number)

**3) Ticks collected on wildlife :**

Host species	host	Nb of ticks	Tick species	Nb of adult male	Nb of adult female	Nb of Nymph
	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					

\* : One collection tube by animal ;(Nb : Number)

Figure 6. Questionnaire épidémiologiques envoyés aux partenaires du réseau CariVET (suite)

### **2.3. Réception des échantillons de tiques et identification morphologique**

Une fois les tiques rapatriées au CRVC de Guadeloupe, les spécimens ont été morphologiquement identifiés à l'aide des clés d'identification disponibles dans l'étude de Walker, 2003. Concernant les tiques collectées sur chien en Guadeloupe, j'ai réalisé les premières identifications, notamment afin de déterminer les traits morphologiques permettant la différenciation entre *Rhipicephalus microplus* et *Rhipicephalus sanguineus*. Puis suite à mon retour sur Paris, Rosalie Aprelon (CIRAD-CRVC) a réalisé toutes les indentifications des échantillons de Guadeloupe et des tiques collectées à travers la Caraïbe.

### **2.4. Broyat et extraction des ADN/ARN des tiques**

Nous avons utilisé les mêmes protocoles de broyat et d'extraction des ARN/ADN de tiques que celui décrit pour les tiques collectées en Guadeloupe et Martinique, décrits en Partie 1 de ce manuscrit. Les échantillons d'ADN/ARN extraits ont ensuite été envoyés à l'ANSES de Maisons-Alfort, afin d'y être prochainement analysés à l'aide de la puce de détection à haut débit développée lors de mon projet de thèse.

## **3. Résultats de la collecte des tiques en Guadeloupe et dans les Caraïbes**

### **3.1. Les tiques collectées en Guadeloupe**

Parmi les quatre vétérinaires ayant répondu favorablement à notre appel à participation, seulement un a été en mesure de collecter des tiques. Le docteur Jolt Evva, et son associée Nathalie Savoye, qui dirigent la clinique vétérinaire Savoye Evva basée à St Rose ont réalisé la collecte de 228 spécimens de tiques *Rhipicephalus sanguineus*, prélevés sur 15 chiens (Tableau 3).

L'analyse des questionnaires épidémiologiques montre que sur les 15 chiens prélevés, la majorité vit en extérieur, libre (Tableau 2). Aucun historique médical lié aux maladies à tiques n'a été reporté. Le niveau d'infestation des chiens est globalement élevé, 8 étaient infestés par plus de 16 tiques et 5 présentaient une infestation modérée, entre 6 et 15 tiques. La majorité des chiens (13) étaient traités occasionnellement aux acaricides.

*Rhipicephalus sanguineus* est une tique à trois-hôtes, qui parasite essentiellement le chien. *Rhipicephalus sanguineus* est une tique dure, capable de survivre dans l'environnement extérieur, mais elle peut également présenter un comportement endophile, évoluant le plus souvent à proximité de son hôte. Cette espèce de tiques est associée à la transmission d'une grande variété d'agents pathogènes, dont certains sont zoonotiques (Dantas-Torres, 2010). A ce jour, aucune étude n'a été menée sur les agents pathogènes susceptibles d'être transmis par *Rhipicephalus sanguineus* en Guadeloupe. Lors de mes rencontres avec les différents vétérinaires de Guadeloupe dans le cadre de la collecte de tiques, aucun n'avait connaissance de l'existence de *Rhipicephalus sanguineus* sur l'île, ni de la capacité de cette tique à transmettre des agents pathogènes notamment au chien. Ainsi, malgré le fort taux d'infestation retrouvé sur les chiens prélevés dans le cadre de la collecte, l'absence de maladie à tiques répertoriée peut être due en partie à un manque de reconnaissance et de diagnostic de ces maladies. Ainsi l'analyse des *Rhipicephalus sanguineus* collectées sur chiens à l'aide de la puce de détection à haut débit permettra de faire une étude exploratoire, et de détecter la présence ou non d'agents pathogènes au sein de ces échantillons de tiques. Caractériser la diversité en agents infectieux transmissibles par cette tique, et la présence potentielle d'agent zoonotique impliquant les chiens est d'autant plus important que le nombre de chiens errant en Guadeloupe est très élevé, et peut constituer un réservoir d'infection (Qablan *et al.*, 2012).

**Tableau 4 : Données relative aux 15 chiens prélevés, fournies par les propriétaires et issues de l'analyse des questionnaires épidémiologiques associés à la collecte des tiques.**

Historique de l'animal		Nombre de chien
Type élevage/lieu de vie	attaché	3
	Libre	12
	En intérieur	0
Historique médical maladie à tique	Oui	0
	Non	15
Niveau infestation par les tiques	Faible ( $\leq 5$ tiques)	2
	Modéré (entre 6 et 15 tiques)	5
	Elevé ( $\geq 16$ tiques)	8
Traitement acaricide	Occasionnel ( $\leq 4$ traitements/an)	13
	Régulier ( $\geq 5$ traitements/an)	0
	Non déterminé	2
Acaricide utilisé	Autre (fipronil)	15 (2)

**Tableau 5 : Descriptif des 228 tiques collectées sur chiens en Guadeloupe. Collecte encadrée par le vétérinaire Jolt Evva, à la clinique Savoye Evva basée à St Rose, en Guadeloupe (CP : 97115).**

Localité	Latitude	Longitude	Date de collecte	Animal	Nombre de tiques <i>Rhipicephalus sanguineus</i>			
					Total	Adulte Mâle	Femelle	Nymphe
Petit Bourg	16.201667	-61.664843	21/04/2017	C1-Kera	26	11		15
St Rose	16.330901	-61.697642	21/05/2016	C2-Rubis	11			11
	16.330901	-61.697642	25/05/2016	C3-Saanelle	6	2		4
ND	ND	ND	08/06/2016	C4-Lassie	2	1	1	
St Rose	16.35185	-61.730171	09/06/2016	C5	6	1	5	
Deshaies	16.306937	-61.794321	16/06/2016	C6	6			6
St Rose	16.330901	-61.697642	17/06/2016	C7-Astuce	11	9	2	
St Rose	16.306937	-61.794321	27/06/2016	C8	34	30	4	
St Rose	16.330901	-61.697642	27/06/2016	C9-Vickie	3	3		
	16.330901	-61.697642	05/07/2016	C10-Luna	25	20		5
	16.330901	-61.697642	11/07/2016	C11-Blue	16	3	1	12
	16.330901	-61.697642	12/07/2016	C12-Rosie	10	10		
Petit Bourg	16.201667	-61.664843	13/07/2016	C13-Lost	16	16		
St Rose	16.330901	-61.697642	16/07/2016	C14-Cheyenne	13	11	2	
	16.330901	-61.697642	16/07/2016	C15-Venus	43	2		41
<b>TOTAL</b>					<b>228</b>	119	15	94

## **2.2 Collecte de tiques dans les Caraïbes**

Parmi les membres du réseau CaribVET souhaitant participer au projet, cinq Pays/Territoires ont pu procéder à la collecte de tiques.

Au bilan, 429 tiques ont été collectées à Trinidad (Tableau 4), 107 à St Lucie, (Tableau 5), 109 à la Barbade (Tableau 6), 255 à St Kitts (Tableau 7), et 20 à Belize (Tableau 8).

A Trinidad, les tiques ont été collectées essentiellement sur chiens avec 371 spécimens de *Rhipicephalus sanguineus* et en moindre quantité sur bovins, avec la collecte de 58 spécimens de *Rhipicephalus microplus* (Tableau 4).

A St Lucie, les tiques ont été collectées sur bovins, permettant le recueil de 104 *Rhipicephalus microplus* et 3 spécimens d'*Amblyomma variegatum* (Tableau 5).

A la Barbade, 90 spécimens de *Rhipicephalus sanguineus*, et 19 spécimens de *Rhipicephalus microplus* ont été collectés sur chiens et bovins (Tableau 6).

A St Kitts, les tiques ont été collectées sur quatre types d'hôtes. 45 spécimens de *Rhipicephalus microplus* ont été collectés sur bovins, et 36 spécimens d'*Amblyomma variegatum* ont été collectés sur bovin et équins. 29 spécimens de *Dermacentor* sp. ont été prélevés sur équins, cependant l'identification morphologique des tiques n'a pas permis d'identifier l'espèce présente. *Dermacentor (Anocentor) nitens* étant connus pour parasiter les chevaux dans les Caraïbes, on peut suspecter la présence de cette espèce dans nos échantillons (Zhang *et al.*, 2015). Finalement 145 spécimens de *Rhipicephalus sanguineus* ont été collectés sur chiens (Tableau 7).

Au Belize, 20 spécimens de tiques ont été collectés sur faune sauvage et sur chiens. Malheureusement, les échantillons reçus étaient en très mauvais état de conservation, il était impossible de déterminer l'espèce ni même le genre des tiques prélevées (Tableau 8).

Concernant les questionnaires épidémiologiques, malheureusement je n'en ai reçu aucun à l'heure actuelle.

**Tableau 4 : Descriptif des 429 tiques collectées à Trinidad, sur chiens et bovins. Collecte encadrée par Roxanne A. Charles (University of the West Indies, Eric Williams Medical Sciences Complex, Mt. Hope, Trinidad).**

Hôte	Animal	Nombre de tiques <i>Rhipicephalus sanguineus</i>				Nombre de tiques <i>Rhipicephalus microplus</i>		
		Total	Adulte		Nymphe	Total	Adulte	
			Mâle	Femelle			Mâle	Femelle
Chien	001	8		8				
Chien	002	21	4	17				
Chien	003	4	3	1				
Chien	004	19	5	4	10			
Chien	006	15	2	1	12			
Chien	007	21	14	7				
Chien	008	10	10					
Chien	0010	12	6	6				
Chien	0011	43	4	12	27			
Chien	0012	12	5	7				
Chien	0021	22	8	14				
Chien	0023	10	5	5				
Chien	0024	29	29					
Chien	0025	6	6					
Chien	0042	12	7	3	2			
Chien	0043	12	12					
Chien	0044	5	5					
Chien	0045	9	3	1	5			
Chien	0046	9			9			
Chien	0063	3		3				
Chien	0064	2		2				
Chien	65	8	6	2				
Chien	68	18	12	6				
Chien	72	10	7	3				
Chien	66	1	1					
Chien	5	25	7	18				
Chien	28	6	2	4				
Chien	60 ev1	8	3	5				
Chien	60 ev2a	5	2	3				
Chien	60 ev2b	6	3	3				
Bovin	71 ev1a					2	1	1
Bovin	71 ev2a					3	2	1
Bovin	71 ev2b					13	4	9
Bovin	73					13		13
Bovin	74					14	4	10
Bovin	SN (75)					13	13	
TOTAL		371	171	135	65	58	24	34



**Tableau 5 : Descriptif des 107 tiques collectées à St Lucie sur bovins. Collecte encadrée par Roxanne A. Charles (University of the West Indies, Eric Williams Medical Sciences Complex, Mt. Hope, Trinidad).**

Hôte	Animal	Nombre de tiques <i>Rhipicephalus microplus</i>			Nombre de tiques <i>Amblyomma variegatum</i>		
		Total	Adulte		Total	Adulte	
			Mâle	Femelle		Mâle	Femelle
Bovin	M1 (120)				2	2	
Bovin	FM1 (120)	6		6			
Bovin	AL1 (121)	11	2	9			
Bovin	AL2 (121)	10	2	8			
Bovin	C1 (122)	8		8			
Bovin	C2 (122)	8		8			
Bovin	C3 (122)	11		11			
Bovin	C4 (122)	10		10			
Bovin	LG1 (123)	7		7			
Bovin	LG2 (123)	6		6			
Bovin	LG3 (123)	6		6			
Bovin	LG4 (123)	6		6			
Bovin	LG5 (123)	7		2			
Bovin	FM1 (124)	8	1	6	1	1	
	<b>TOTAL</b>	<b>104</b>	<b>5</b>	<b>93</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0</b>

**Tableau 6 : Descriptif des 109 tiques collectées à la Barbade, sur chiens et bovins. Collecte encadrée par David Elcock et Mark Trotman (Services vétérinaires, Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et de la gestion des ressources en eau, St Michael, Barbados).**

Hôte	Animal	Nombre de tiques <i>Rhipicephalus sanguineus</i>				Nombre de tiques <i>Rhipicephalus microplus</i>		
		Total	Adulte		Nympe	Total	Adulte	
			Mâle	Femelle			Mâle	Femelle
Bovin	1305-16					4		4
Bovin	1306-16					4		4
Chien	1323-16	5	2	3				
Chien	1322-16	4	3		1			
Bovin	962-16					11	1	10
Chien	960-16	8	1	7				
Bovin	827-16	5		5				
Bovin	782-16	10	1	9				
Chien	1062-16	6	2		4			
Chien	1063-16	7	4	2	1			
Chien	1070-16	41	5	36				
Chien	1124-16	4		4				
	<b>TOTAL</b>	<b>90</b>	<b>18</b>	<b>66</b>	<b>6</b>	<b>19</b>	<b>1</b>	<b>18</b>

**Tableau 7 : Descriptif des 255 tiques collectées à St Kitts, sur chiens, bovins et équins. Collecte encadrée par Jennifer Ketzis (Ross University, Basseterre, St Kitts).**

Lieu de la collecte	Date de collecte	Hôte	Animal	Nombre de tiques <i>Rhipicephalus sanguineus</i>				Nombre de tiques <i>Rhipicephalus microplus</i>				Nombre de tiques <i>Amblyomma variegatum</i>				Nombre de tiques <i>Dermacentor</i> spp.		
				Total	Adulte Mâle	Femelle	Nymphe	Total	Adulte Mâle	Femelle	Nymphe	Total	Adulte Mâle	Femelle	Total	Adulte Mâle	Femelle	Nymphe
Abattoir	12/09/2016	Bovin	K1					24	2	22								
Saddlers	19/09/2016	Bovin	K2					8	2	3	3	2		2				
Abattoir	31/08/2016	Bovin	K3					13	1	12								
St. Peter's	10/09/2016	Chien	K4	3	2	1												
St. Peter's	10/09/2016	Chien	K5	8	6	2												
St. Peter's	10/09/2016	Chien	K6	7	2		5											
St. Peter's	10/09/2016	Chien	K7	10	6	4												
St. Peter's	10/09/2016	Chien	K8	9	9													
Monkey Hill	10/09/2016	Chien	K9	6		6												
Monkey Hill	10/09/2016	Chien	K10	6	2	4												
St. Peter's	22/08/2019	Chien	K11	7	2	5												
St. Peter's	22/08/2019	Chien	K12	20	17		3											
St. Peter's	22/08/2019	Chien	K13	10	2		8											
Old Road	29/08/2016	Chien	K14	18	6	4	8											
Old Road	29/08/2016	Chien	K15	5			5											
Basseterre	22/08/2019	Chien	K16	7	7													
Basseterre	22/08/2019	Chien	K17	5	5													
Basseterre	22/08/2019	Chien	K18	11	7	4												
Basseterre	22/08/2019	Chien	K19	13	8	5												
Saddlers	19/09/2016	Equin	K20												19	5	10	4
Trinity Stables	26/08/2016	Equin	K21									8	5	3				
Trinity Stables	26/08/2016	Equin	K22												6		4	2
Trinity Stables	26/08/2016	Equin	K23												4		4	
Trinity Stables	01/09/2016	Equin	K24									10	9	1				
Trinity Stables	01/09/2016	Equin	K25									4	4					
Trinity Stables	01/09/2016	Equin	K26									8	8					
Saddlers	19/09/2016	Equin	K27									4	2	2				
<b>TOTAL</b>				<b>145</b>	81	35	29	<b>45</b>	5	37	3	<b>36</b>	28	8	<b>29</b>	5	18	6

**Tableau 8 : Descriptif des 20 tiques collectées à Belize sur Faune sauvage et sur chiens. Collecte encadrée par Isabelle Paquet-Durand de la clinique vétérinaire "Belize Wildlife and Referral Clinic" (BWRC).**

Date de collecte	Hôte	Animal	Nombre de tiques (non identifiables)		
			Total	Male	Femelle
<b>26/04/2016</b>	Ocelot ( <i>Leopardus pardalis</i> )	T1	6	6	
<b>ND</b>	Coati roux ( <i>Nasua nasua</i> )	T9	3	3	
<b>ND</b>	Fourmilier ( <i>Tamandua mexicana</i> )	T10	3	1	2
<b>02/09/2016</b>	Fourmilier ( <i>Tamandua mexicana</i> )	T11	4	2	2
<b>01/11/2016</b>	Kinkajou ( <i>Potos flavus</i> )	T14	1		1
<b>03/10/2016</b>	Chien ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	T18	2	2	
<b>ND</b>	Chien ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	T19	1	1	
		<b>TOTAL</b>	<b>20</b>	15	5

#### **4. Discussion et perspectives**

Nous avons fait appel au réseau vétérinaire local de Guadeloupe et au réseau international CaribVET afin (1) de récolter des tiques à travers la Caraïbe (2) de récolter de nouvelles espèces de tiques d'importance médicale et vétérinaire, telles que des *Rhipicephalus sanguineus* et *Dermacentor* spp., impliquant des hôtes vertébrés autres que les bovins.

En Guadeloupe, malgré la diffusion de notre appel à participation auprès des services vétérinaires recensés par la DAAF, seules quatre personnes ont souhaité participer à la collecte de tiques. Puis finalement, une seule personne a pu nous fournir des échantillons. De même dans les Caraïbes, notre appel à participation a pu être largement diffusé auprès des membres du réseau international CaribVET et malgré un engouement initial pour le projet, au final, seuls 5 pays ont participé à la collecte de tiques. Il serait intéressant pour l'avenir, notamment dans le cas de futures collectes, de comprendre les raisons de ce manque de participation. En effet il pourrait s'agir peut être d'un manque de moyens budgétaires, de communication, d'information, de confiance, ou encore l'aide demandée semblait trop lourde à mettre en œuvre, etc... Le manque de communication entre la sphère clinique et la sphère recherche est un argument que l'on pourrait avancer. Certains des cliniciens rencontrés en Guadeloupe ont exprimé un mécontentement face au manque de retour des informations obtenues lors de précédents projets de recherche auxquels ils avaient participé de façon bénévole. Le fait de demander de remplir un questionnaire épidémiologique en supplément de la collecte a également dû dissuader certains participants, tant au niveau local qu'au niveau des Caraïbes.

Au bilan, grâce à l'aide de vétérinaires locaux et du réseau CaribVET, nous avons pu récolter des tiques provenant de cinq pays de la Caraïbes et d'Amérique latine, Trinidad, St Lucie, Barbade, St Kitts et du Belize, et incluant de nouvelles espèces de tiques, notamment des *Rhipicephalus sanguineus* et des *Dermacentor* spp.. Malgré le manque de représentativité de l'échantillonnage et l'impossibilité d'identifier les seuls échantillons collectés sur faune sauvage (Belize), les tiques collectées vont permettre de réaliser la première étude épidémiologique exploratoire à large échelle des agents pathogènes potentiellement transmis par les tiques dans les Caraïbes. Les ADN/ARN ont déjà été extraits et expédiés à l'ANSES de Maisons-Alfort et vont être prochainement analysés à l'aide des puces de détection (bactéries/parasites et virus) à haut débit développées dans ce travail de thèse



## Collecte de tiques dans les Caraïbes

### Etudes épidémiologiques exploratoires

- Diversification de l'échantillonnage : tique provenant de nouvelles régions des Caraïbes, correspondant à de nouvelles espèces et collectées sur de nouveaux hôtes vertébrés (autre que le bovin).
- Organisation de la collecte de tique dans les Caraïbes
  - Réseau vétérinaire de Guadeloupe (DAAF):
    - ➔ 228 spécimens de tiques *Rhipicephalus sanguineus* collectées sur chien (Jolt Evva, Clinique vétérinaire Savoye Evva, à St Rose).
  - Réseau vétérinaire de la Caraïbe, CaribVET :
    - ➔ 429 tiques de Trinidad (*Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus*)
    - ➔ 107 de St Lucie (*Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma variegatum*)
    - ➔ 109 de la Barbade (*Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus*)
    - ➔ 255 de St Kitts (*Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma variegatum*, *Dermacentor* spp.)
    - ➔ 20 de Belize (collecte sur faune sauvage, mais pas d'identification des tiques)
- Perspectives

Etude épidémiologique exploratoires à haut débit des agents pathogènes présents dans les tiques des Caraïbes → Analyse des échantillons de tique collectés dans les Caraïbes à l'aide de la PCR microfluidique en temps réel.

# **Discussion générale et Perspectives**

Du fait de l'importance économique et sanitaire des maladies transmises par les tiques, et du manque significatif de données épidémiologiques concernant la diversité en agents pathogènes circulant dans les tiques caribéennes, la visée principale de ma thèse était de (1) développer des outils d'investigations épidémiologiques à haut débit, et (2) de réaliser des études épidémiologiques exploratoires sur des échantillons de tiques collectées dans les Caraïbes.

### **Développement des outils d'investigations à haut débit des bactéries, parasites et virus transmis par les tiques et d'importance médicale et vétérinaire dans les Caraïbes**

Les outils de détection à haut débit développés dans cette étude reposent sur la technologie de PCR microfluidique en temps réel (Biomark<sup>TM</sup> dynamic array, Fluidigm). Cette technologie présente plusieurs avantages non négligeables en recherche épidémiologique :

- (1) elle offre le choix entre deux formats de puce, le format 48.48 et le format 96.96 qui permettent de réaliser 2304 ou 9216 réactions de PCR en temps réel respectivement,
- (2) elle ne requière qu'un faible volume en ADN/ADNc, de l'ordre de 1,25µL, permettant ainsi de conserver un stock d'ADN et ADNc pour d'autres expérimentations (notamment les confirmations par PCR, Nested PCR et séquençage Sanger),
- (3) la technologie présente un haut niveau de spécificité, via l'utilisation de sondes Taqman,
- (4) les réactions d'amplification sont rapides, un essai en 48.48 (96.96) se déroule en environ trois heures (quatre heures),
- (5) selon le format de puce choisi, elle permet ainsi la détection simultanée de 47 à 95 agents pathogènes au sein de 47 à 95 échantillons biologiques lors d'une seule expérimentation,
- (6) elle est adaptable à chaque situation épidémiologique, en effet les couples amorces/sonde peuvent être remplacés à la demande en fonction des agents pathogènes que l'on souhaite détecter.

Dans cette étude nous avons développé deux systèmes de détection adaptés au criblage d'agents pathogènes transmis par les tiques dans la zone Caraïbe. Le premier outil permet le criblage des bactéries et parasites dans des échantillons d'ADN de tique à l'aide de puces 96.96, le second permet le criblage des virus dans des échantillons d'ADNc (ARN) de tique à l'aide de puces 48.48.

La première étape décisive dans le développement de ces outils de détection était de définir le répertoire d'agents pathogène' à rechercher (Figure 1).

En effet, la pertinence d'un outil de détection nécessite de savoir en premier lieu quels sont les agents pathogènes ou microorganismes d'intérêt que l'on souhaite détecter. Afin d'inventorier les cibles à surveiller dans les caraïbes, j'ai d'abord analysé la littérature scientifique et listé les agents pathogènes décrits au moins une fois ou suspectés de circuler dans les tiques de la zone Néotropicale. L'ensemble des données recueillies a fait l'objet d'un article de revue, qui constitue la première synthèse réactualisée des connaissances épidémiologiques des tiques et maladies à tiques dans les Caraïbes depuis Morel en 1967.

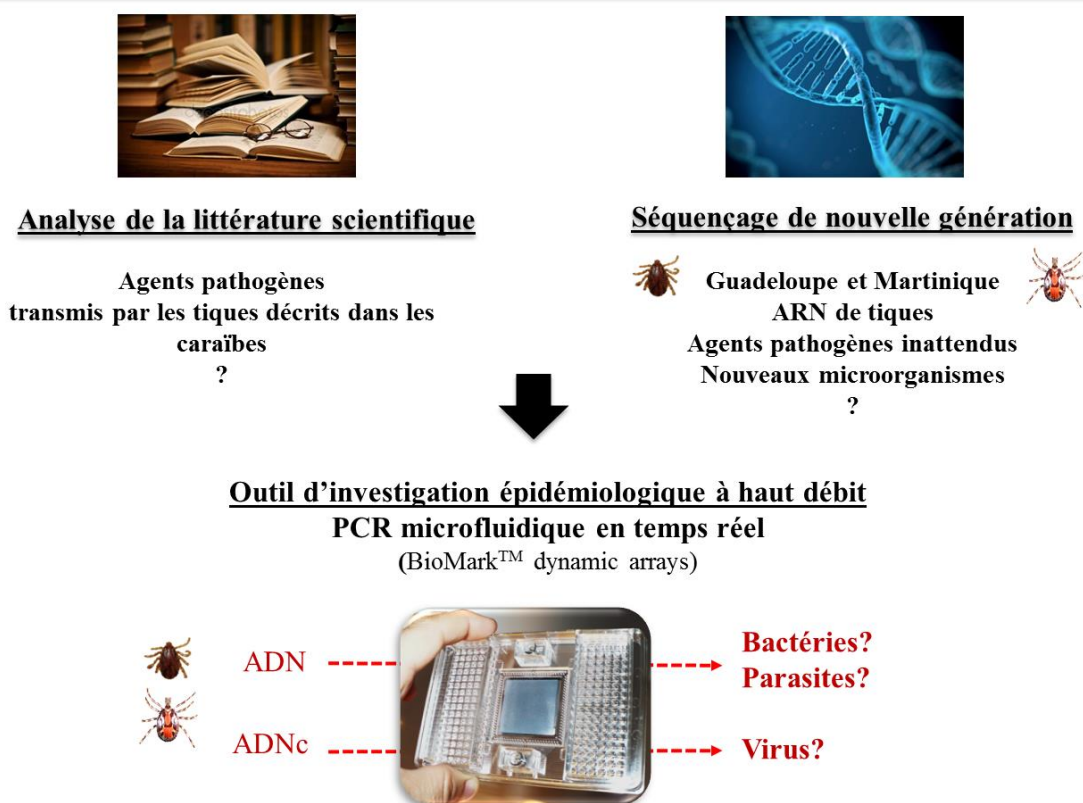
Cependant, les données de la littérature étant pour la plupart anciennes et limitées à la recherche de quelques agents pathogènes bien connus, nous avons souhaité obtenir une vision globale, sans *a priori*, et actuelle de la diversité en agents pathogènes de tiques collectées sur le terrain. Ainsi nous avons réalisé un séquençage du transcriptome total d'un pool de tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* collectées en Guadeloupe et en Martinique. Le séquençage nous a permis (1) d'appréhender la diversité en agents pathogènes présents dans les tiques des Antilles Françaises, incluant la détection concomitante de séquences d'origine bactérienne, parasitaire et virale (2) de découvrir de nouvelles cibles d'intérêt, non référencées dans la littérature nécessitant un suivi et ainsi de compléter l'inventaire des microorganismes et agents pathogènes à suivre dans les tiques caribéennes à l'aide des outils d'investigations développés dans cette étude

La mise au point des sondes et amorces permettant la détection des agents pathogènes à suivre était la deuxième étape critique du développement des outils d'investigation. En effet le développement des oligonucléotides utilisés en PCR microfluidique temps réel suit des règles très strictes, les sondes et amorces devant toutes fonctionner sous les mêmes conditions réactionnelles. De plus, pour certains microorganismes, peu de séquences de références sont disponibles dans les bases de données du NCBI, limitant la possibilité de trouver des zones génomiques spécifiques de l'agent pathogène ciblé. Ainsi, le temps consacré au développement des oligonucléotides n'est pas négligeable, en partie dû à la recherche de compromis entre respect des règles de création des oligonucléotides et la recherche de zones



spécifiques. Au cours de cette étude j'ai développé une puce de détection constituée de 45 et 17 lots d'amorces et de sondes ciblant respectivement des espèces bactériennes et parasitaires, et de sept et cinq lots d'amorces et de sondes ciblant respectivement des genres bactériens et parasitaires. J'ai également développé trois lots d'amorces et de sondes ciblant des espèces virales qui se sont ajoutés aux 22 lots d'amorces et de sondes déjà disponibles. J'ai également dessiné quatre lots d'amorces et de sondes ciblant les quatre nouveaux virus détectés en séquençage Illumina. En plus de la recherche des agents pathogènes, la puce permet également l'identification moléculaire de trois espèces de tiques, les espèces les plus importantes d'un point de vue sanitaire dans les Caraïbes : *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus microplus*, et *Rhipicephalus sanguineus*.

***A la découverte des agents pathogènes et nouveaux microorganismes  
transmis par les tiques dans les Caraïbes***



**Figure 9. Objectifs et méthodologie de la thèse.**

Nous avons démontré que la majorité des sets d'amorces/sondes développés et testés en PCR temps réel TaqMan à l'aide du LightCycler 480 étaient capables de détecter leur cible, exceptés les oligonucléotides ciblant *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Candidatus Rickettsia amblyommi*, *Borrelia turicatae*, et le *Nairobi sheep disease virus*.

Lors de l'analyse de spécificité de nos oligonucléotides à l'aide de la PCR microfluidique temps réel, là encore la majorité des oligonucléotides se sont révélés spécifiques de leur cible. Néanmoins, certains oligonucléotides peuvent croiser avec des espèces proches. De plus, une partie des amorces/sondes n'ont pu être testées que sur des séquences plasmidiques portant les séquences cibles, ce qui n'exclut pas un risque de croisement lorsqu'elles seront testées sur des échantillons biologiques. Finalement, bien que l'étape de pré-amplification permet d'enrichir la part en ADN (ou ADNc) cible au sein des échantillons de tique et ainsi d'améliorer la sensibilité du système, elle peut également impacter l'efficacité de certains oligonucléotides. En effet, certains groupes de sondes/amorces ont la même cible génomique, et entrent ainsi en compétition de fixation lors de l'étape de pré-amplification au cours de laquelle ils sont mélangés. C'est le cas par exemple pour les oligonucléotides ciblant le phylum parasitaire Apicomplexa, les genres *Theileria* et *Hepatozoon* et les espèces *Theileria velifera*, *Theileria parva* qui ont tous une cible commune, les gènes de l'ARNr 18S. Ainsi à l'avenir, si le nombre de séquences disponibles dans les bases de données le permettent, différentes cibles génomiques devraient être ciblées notamment au sein d'un même groupe microbien proche afin d'éviter un risque de compétition de fixation.

Au bilan les outils de détections développés dans cette étude permettent le suivi épidémiologique de : 40 espèces et sept genres bactériens ; de 17 espèces, trois genres et un phylum parasitaire ; de 27 Arbovirus d'intérêt médical et vétérinaire et de quatre nouveaux virus identifiés en séquençage Illumina dans les tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus*. La performance de détection de ces outils d'investigation épidémiologique a été testée sur des échantillons de tiques de terrain, les mêmes tiques utilisées pour le séquençage Illumina : les *Amblyomma variegatum* et les *Rhipicephalus microplus* collectées dans les Antilles Françaises. De plus, nous avons qualitativement comparé la sensibilité et la spécificité de détection entre le système Biomark, permettant la détection des bactéries et parasites, et deux protocoles de PCR temps réel utilisés en routine au laboratoire de référence du CIRAD de Guadeloupe permettant la détection de *Ehrlichia ruminantium* et des parasites *Babesia bovis* et *B. bigemina* (chapitre 2a de ce manuscrit, données supplémentaires 2 et 3). En règle générale, la sensibilité semble supérieure avec le

système Biomark : un échantillon ayant un Cp de 25 avec le système Biomark, génère 5 Ct de plus avec la PCR temps réel. Sur la totalité des échantillons, la comparaison de la sensibilité et de la spécificité de la PCR temps réel par rapport au système Biomark est de 90,6% et 83,7%, respectivement avec une correspondance entre les deux tests de 91,2%, montrant la très bonne performance de la puce de détection Biomark. Sachant que notre protocole inclut une étape de pré-amplification avant la PCR microfluidique en temps réel, cela pourrait expliquer la meilleure sensibilité de la méthode. Cependant, ce test de comparaison reposait sur l'utilisation d'échantillons de terrain, il sera donc important de refaire ce test à l'aide de gammes de dilution d'échantillons contrôles, qui seront testées avec les deux méthodes.

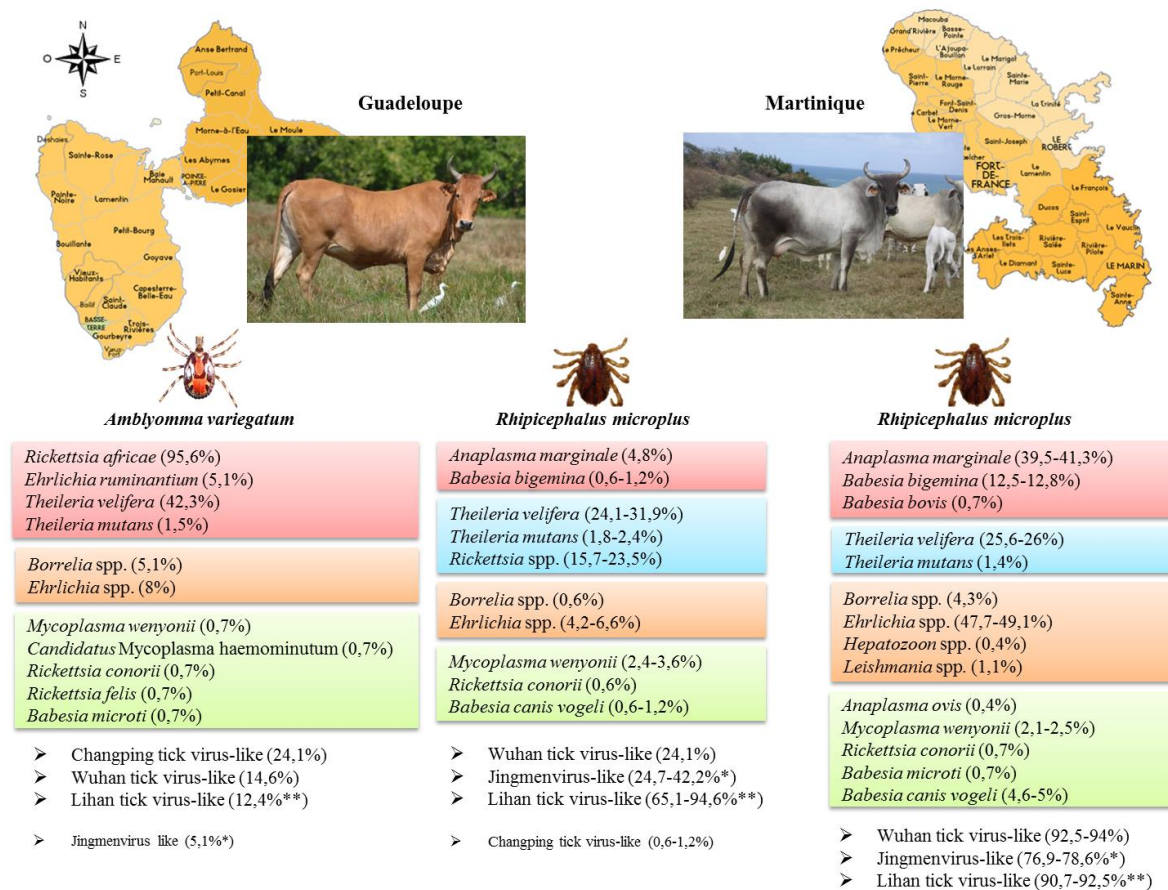
Néanmoins, les outils d'investigation épidémiologique à haut débit développés dans cette étude sont dédiés à la recherche et non au diagnostic, et offre l'opportunité d'explorer en un temps très court la diversité en agents pathogènes et microorganismes d'intérêts au sein d'échantillon biologique.

### **Situation épidémiologie des bactéries et parasites détectés dans les tiques des Antilles Françaises**

#### ***Détection des agents pathogènes transmis par les tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* dans les Antilles Françaises.***

Les *Amblyomma variegatum* analysées dans notre étude ont été retrouvées infectées par *Rickettsia africae* (95.6%), *Ehrlichia ruminantium* (5.1%), *Theileria velifera* (42.3%) et *Theileria mutans* (1.5%) (Figure 2). Contrairement à *Rickettsia africae*, les trois autres agents pathogènes n'ont pas été détectés en séquençage Illumina. Deux raisons peuvent expliquer un tel résultat. D'un côté, en séquençage Illumina nous avons analysé un pool d'ARN, de toutes les tiques collectées en Guadeloupe et Martinique et de l'autre côté en PCR microfluidique temps réel nous avons analysé les ADN d'échantillons de tiques individuelles. Ainsi, les agents pathogènes peu détectés en ADN, présentant des niveaux d'infection faible, tels que *Ehrlichia ruminantium* et *Theileria mutans* avaient peu de chance d'être détectés en NGS, faisant partie des séquences sous représentées. Concernant l'absence de détection en séquençage de *Theileria velifera*, dont le taux d'infection en ADN est parmi les plus élevés, il s'agit très certainement d'un manque de séquences de références disponibles pour cette espèce dans la banque de données NCBI. En effet seules 28 séquences de l'ARNr 18S et une séquence de la sous-unité 3 de la cytochrome oxydase c appartenant à *Theileria velifera* sont

disponibles dans la base de données GenBank du NCBI. Sachant que la préparation des échantillons d'ARN en vue du séquençage Illumina a impliqué une rétro-transcription aléatoire des ARN, d'autres séquences transcriptomiques de *Theileria velifera* ont dû être probablement synthétisées, mais non identifiées par manque de données de référence. Ceci pourrait également expliquer la présence de séquences *Theileria* spp. détectées en séquençage Illumina mais non rattachées à une espèce en particulier. Finalement, *Rickettsia africae* étant l'agent pathogène le plus abondant dans les tiques *Amblyomma variegatum* analysées, cela explique le nombre élevé de contigs retrouvés en séquençage Illumina pour cette espèce. Ces agents pathogènes, tout comme leur vecteur, sont originaires d'Afrique. *Amblyomma variegatum* a été introduite dans les Caraïbes au début du 19<sup>ème</sup> siècle durant l'époque du commerce triangulaire qui consistait à transporter du bétail Afrique de l'Ouest vers les Antilles. *Amblyomma variegatum* a d'abord été importée en Guadeloupe, probablement via l'importation de bétail infesté provenant du Sénégal vers 1828-1830, puis à Marie-Galante et Antigua. A partir de 1948, elle fut introduite en Martinique, puis elle s'est dispersée rapidement dans 18 îles des Caraïbes, via le transport d'animaux infestés, mais également via l'introduction dans les années 1950s de l'aigrette du bétail (*Bubulcus ibis*). Cet oiseau migrateur peut être l'hôte des stades immatures de la tique (larves et nymphes) en vivant à proximité du bétail et ainsi peut transporter des spécimens de tiques d'une île à une autre (Barré and Uilenberg., 2010 ; Beati *et al.*, 2012). Le bovin joue un rôle central dans l'épidémiologie de trois de ces agents pathogènes, étant le réservoir d'*Ehrlichia ruminantium*, et des deux espèces de *Theileria*. *Ehrlichia ruminantium* est responsable de la cowdriose (« heartwater » pour les anglophones) pouvant être fatale chez les ruminants. *Theileria velifera* n'est pas considéré comme pathogène pour le bovin, contrairement à *Theileria mutans* qui peut induire des cas de theileriose (Berggoetz *et al.*, 2014). La présence d'*Ehrlichia ruminantium* dans nos échantillons de tiques n'est pas inattendue, en effet le Guadeloupe fait partie des trois foci d'infection, avec Marie-Galante et Antigua (Vachiéry *et al.*, 2008). La distribution de *Theileria velifera* et de *Theileria mutans* dans les Caraïbes n'est pas connue, probablement dû à l'absence de recherche de ces deux parasites compte tenu de leur faible pouvoir pathogène. Les races bovines créoles sont résistantes à ces infections, lorsque le bovin survit à la phase aigüe de la maladie, il devient porteur asymptomatique et réservoir de ces agents pathogènes.



**Figure 2. Bilan du criblage des agents pathogènes dans les tiques de Guadeloupe (137 *Amblyomma variegatum* et 175 *Rhipicephalus microplus*) et de Martinique (285 *Rhipicephalus microplus*) à l'aide des deux systèmes de PCR microfluidique en temps réel développés dans cette étude (l'un ciblant les bactéries-parasites, et l'autre les arbovirus). Les taux d'infection de ces agents pathogènes dans les tiques collectées sont présentés entre parenthèse. Sur fond rouge : les agents pathogènes connus et attendus dans ce vecteur et dans la zone d'étude; Sur fond orange : les microorganismes identifiés au niveau du genre bactérien ou parasitaire mais non identifiés au niveau de l'espèce, et dont l'identification doit être réalisée ; Sur fond vert : les agents pathogènes inattendus dans ce vecteur et/ou dans cette zone d'étude, dont la détection doit être confirmée ; Sur fond bleu : les agents pathogènes connus pour circuler dans la zone mais non connus pour être transmis par ce vecteur ; Sur fond blanc : les virus identifiés par séquençage Illumina puis suivis en PCR microfluidique temps réel. (\* : Taux d'infection associé au segment 4 du Jingmenvirus-Like ; \*\* Taux d'infection associé au segment S du Lihan tick virus-Like).**

Ainsi la contrainte économique et sanitaire liée à la présence de ces agents pathogènes en Guadeloupe est d'avantage relative à (1) l'impossibilité d'importer des races d'élevage non autochtones, qui serait plus productives mais également plus sensibles à ces maladies (2) le risque d'introduction et de dispersion de la tique et des agents pathogènes associés, plus particulièrement *Ehrlichia ruminantium*, dans des zones non endémiques et donc sensibles, notamment via le mouvement d'animaux (bovins, chiens, oiseaux migrateurs) (Barré *et al.*, 1987). Finalement, *Rickettsia africae*, contrairement aux trois autres est un agent pathogène pour l'Homme, responsable de la « Fièvre de morsure de tique africaine » (African tick bite

fever). Bien que considérée comme bénigne, la maladie peut engendrer des symptômes cliniques neurologiques et cardiaques graves chez certains patients (Maina *et al.*, 2014). *Rickettsia africae* circule largement dans les Caraïbes, elle a été détectée aussi bien dans les tiques, que dans des sera de ruminants et d'humains (Parola *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 2010b). Malgré une forte prévalence, peu de cas de rickettsiose ont été décrits, en dehors des deux cas clairement identifiés chez deux patients français revenant d'un voyage en Guadeloupe (Parola *et al.*, 1998; Raoult *et al.*, 2001). Néanmoins, *Rickettsia africae* peut être une menace pour la santé humaine dans les Caraïbes, les acteurs de la santé public, notamment les cliniciens, devraient être informés de sa présence (Parola *et al.*, 1998; Raoult *et al.*, 2001). En effet, bien que les adultes d'*Amblyomma variegatum* soient fortement associés à l'hôte bovin, les stases immatures peuvent se nourrir sur une variété d'hôtes plus larges, tels que l'Homme (Morel, 1967).

Les *Rhipicephalus microplus* analysées dans notre étude ont été retrouvées infectées par *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, et *Babesia bovis*, ce dernier détecté seulement en Martinique (Figure 2). Bien que ces trois agents pathogènes du bovin soient considérés comme endémiques dans les Caraïbes, ils sont habituellement recherchés et décrits dans des échantillons de serum de bovin. Notre étude constitue ainsi la première évaluation des taux d'infection de ces agents pathogènes dans des échantillons de tiques (Camus and Barre., 1995). Les taux d'infection de ces trois agents pathogènes sont très variables entre la Guadeloupe et la Martinique. Cependant en Martinique les 285 tiques collectées ont été prélevées sur 29 animaux différents provenant de 29 élevages, alors qu'en Guadeloupe les 175 tiques collectées ont été prélevées sur 20 animaux mais provenant de seulement 13 élevages. Ainsi le manque d'homogénéité entre les deux échantillonnages ne permet pas de comparer statistiquement les taux d'infection des *Rhipicephalus microplus* observés entre les deux îles. Contrairement à *Anaplasma marginale* et *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* n'avait pas été détecté par séquençage Illumina. A l'instar des précédentes observations, le biais de détection du séquençage vis à vis des séquences sous-représentées peut être à l'origine de l'absence de séquences permettant l'identification de *Babesia bovis* dans les données contigs obtenus.

Ces trois agents infectieux sont pathogènes pour le bovin, et sont tous les trois connus pour être transmis par *Rhipicephalus microplus*, l'espèce de tique la plus largement répandue à travers les Caraïbes. C'est une espèce de tique originaire d'Asie du Sud, qui a été successivement introduite en Afrique et en Amérique, puis finalement importée dans les Caraïbes depuis l'Amérique Latine via le transport de bovins infestés au 16<sup>ème</sup>/17<sup>ème</sup> siècles

(Barré and Uilenberg., 2010). *Rhipicephalus microplus* est une tique à un hôte qui présente un fort tropisme pour les bovins, et exceptés les phénomènes de transfert d'hôte, elle réalise généralement la totalité de son cycle sur le même animal. L'endémicité de ces agents pathogènes signifie qu'ils évoluent dans un environnement stable, entre le vecteur tique, *Rhipicephalus microplus*, et le réservoir, ici le bovin (Bock *et al.*, 2004 ; Kocan *et al.*, 2004). En effet les races bovines locales présentes dans les Caraïbes sont considérées comme résistantes à ces infections, et développent des infections persistantes asymptomatiques, qui peuvent durer des mois voire des années selon l'agent infectieux (Bock *et al.*, 2004 ; Kocan *et al.*, 2004). Ainsi, à l'instar de la cowdriose et de la theileriose, les cas de babésioses ou d'anaplasmoses bovine se déclarent généralement chez des races bovines importées (Camus and Montenegro-James, 1994). Les agents pathogènes transmis par *Rhipicephalus microplus*, sont donc eux aussi un frein majeur à l'importation de races d'élevage non autochtones, plus productives mais plus sensibles aux maladies à tiques dans les Caraïbes.

#### ***Détection d'agents pathogènes inattendus dans les tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* dans les Antilles Françaises.***

Notre étude a permis de détecter des agents pathogènes inattendus au sein des tiques des Antilles Françaises. Le terme inattendu employé ici décrit la détection (1) de genres bactériens ou parasitaires non accompagnés de l'identification d'une espèce (2) d'agents pathogènes connus pour circuler dans la zone, mais non connus pour être vectorisés par la tique dans laquelle il a été détecté, ou un agent pathogène connu mais jamais décrit dans les Caraïbes (Figure1).

**Dans chacune des espèces de tiques et dans chacune des îles, des *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp. , *Leishmania* spp. ont été détectés.**

Des *Borrelia* spp. ont été retrouvées dans 5.1% des *Amblyomma variegatum*, et 0.6% et 4.3% des *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et Martinique respectivement. Aucune des espèces de *Borrelia* ciblées par la puce de détection n'a été identifiée. Le séquençage Illumina avait lui aussi révélé la présence de *Borrelia* spp., avec quatre séquences permettant l'identification de *Borrelia miyamotoi*, et deux séquences celle de *Borrelia theileri*. *Borrelia miyamotoi* est un agent pathogène de l'homme, essentiellement distribué dans l'hémisphère nord, et transmis par les tiques du genre *Ixodes* (Krause *et al.*, 2015). *Borrelia theileri* est un agent pathogène des ruminants retrouvé essentiellement dans l'hémisphère sud, et transmis

par les tiques dures du genre *Rhipicephalus*, tel que *Rhipicephalus microplus* (Smith *et al.*, 1978 ; McCoy *et al.*, 2014). *Borrelia theileri*, fait partie des agents pathogènes recherchés par la puce de détection, et n'a pas été détecté dans nos échantillons. Par contre *Borrelia myamotoi* n'a pas été recherché, ni *Borrelia burgdorferi sensu stricto* dont le design a été invalidé (Hou *et al.*, 2015). La recherche de(s) l'espèce(s) de *Borrelia* présente(s) au sein de nos échantillons nécessite de plus amples investigations, leur identification permettrait (1) de décrire pour la première fois de façon certaine la présence de spirochètes dans les tiques caribéennes (2) de voir si la même espèce infecte *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* (3) d'estimer un risque potentiel en santé humaine, sachant que l'on ne peut exclure le risque que ces espèces de tiques parasitent l'homme, notamment les stases immatures d'*Amblyomma variegatum*.

Des *Ehrlichia* spp. ont été retrouvées dans 8% des *Amblyomma variegatum* (autre que les tiques positives pour *Ehrlichia ruminantium*), et 4.2-6.6% et 47.7-49.1% des *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et Martinique respectivement. En séquençage Illumina, des séquences *Ehrlichia* spp. avaient également été rapportées, dont une séquence identifiant l'agent *Ehrlichia muris*-like (KP702294.1). *Ehrlichia muris* affecte généralement les rongeurs, cependant l'agent *Ehrlichia muris*-like a été récemment décrit aux USA comme pathogène pour l'homme et transmis par les tiques *Ixodes scapularis* (Lynn *et al.*, 2015). Malheureusement *Ehrlichia muris* ou l'agent *Ehrlichia muris*-like ne sont pas ciblés par la puce de détection, ainsi on ne peut exclure que ces bactéries soient à l'origine des détections obtenues.

Une nouvelle espèce d'*Ehrlichia* nommée *Ehrlichia minasensis* (*E. mineirensis*) a été récemment décrite dans des tiques *Rhipicephalus microplus* et des bovins au Canada, Brésil et en Polynésie Française (Aguiar *et al.*, 2014; Cabezas-Cruz *et al.*, 2016; Laroche *et al.*, 2016). Là encore il s'agit d'une espèce non ciblée par la puce de détection, sa présence au sein de nos échantillons devrait être recherchée. Finalement, comparé au taux d'infection élevés des *Ehrlichia* spp. au sein des *Rhipicephalus microplus* de Martinique, on a obtenu très peu de séquences *Ehrlichia* spp. en séquençage Illumina. Cela suggère que l'espèce(s) *Ehrlichia* présente(s) dans nos échantillons disposera(en)t de peu ou pas de séquences de références dans les bases de données nucléotidiques du NCBI, à l'instar de l'observation faite pour *Theileria velifera*.

Enfin, des espèces parasitaires appartenant aux genres *Hepatozoon* (0.4%), et *Leishmania* (1.1%) ont été détectées en Martinique chez les *Rhipicephalus microplus*. *Hepatozoon canis* et *Leishmania infantum*, sont deux agents pathogènes du chien, déjà



associés avec les tiques *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas-Torres, 2010). Bien que ces deux espèces soient ciblées par la puce de détection, elles n'ont pas été détectées en association avec les genres parasites correspondant. De même aucune séquence appartenant à ces genres parasites n'a été détectée en séquençage Illumina. Cependant vu le très faible taux d'infection observé, l'absence d'identification de ces parasites en séquençage Illumina n'est pas surprenant. Au vu du caractère inattendu de ces détections, que ce soit en termes de vecteur, de zone géographique ou d'hôte vertébré, ces résultats doivent être impérativement confirmés.

**Finalemt, la puce de détection a permis l'identification de plusieurs agents pathogènes inattendus dans les espèces de tiques criblées nécessitant de plus amples investigations (Figure 2).**

*Anaplasma ovis* est un agent pathogène des petits ruminants, généralement détecté chez le mouton, et transmis par les tiques du genre *Dermacentor* (Rar and Golovljova, 2011), *Mycoplasma wenyonii* et *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, sont respectivement des agents pathogènes du bovin et du chat. La transmission vectorielle des Mycoplasmes bien que suspectée n'est pas démontrée (Messick *et al.*, 2004 ; Maggi *et al.*, 2013). *Rickettsia conorii* et *Rickettsia felis* sont des agents pathogènes de l'Homme, chacun retrouvé chez le chien et le chat, habituellement transmis par *Rhipicephalus sanguineus* et les puces *Ctenocephalides felis* respectivement (Parola *et al.*, 2013 ; Pérez-Osorio *et al.*, 2008 ; Kelly *et al.*, 2010a). *Babesia canis vogeli* est un agent pathogène du chien, transmis par *Rhipicephalus sanguineus* (Uilenberg., 2006). Finalemt *Babesia microti* est un agent pathogène humain, transmis par *Ixodes scapularis*, et dont les rongeurs sont le réservoir (Vannier *et al.*, 2008). Ces agents pathogènes ont été détectés dans nos échantillons de tiques à des taux d'infection variables. Comme on peut le constater, les vecteurs arthropodes habituels de ces agents pathogènes, ainsi que leurs hôtes mammifères habituels, pour la plupart, ne correspondent pas à la nature de nos échantillons. Ces agents pathogènes n'ont pas non plus été identifiés en séquençage Illumina, mais ceci peut être expliqué par les faibles taux d'infection relevés pour chacun de ces microorganismes. La présence de ces agents pathogènes doit bien évidemment être confirmée. Néanmoins plusieurs facteurs bioécologiques pourraient influencer la présence de tels agents pathogènes au sein de nos échantillons de tiques :

(1) L'état physiologique des tiques collectées. Les tiques ont été prélevées sur les bovins étaient majoritairement gorgées. Ce qui induit un biais de détection non négligeable dans notre étude. En effet ceci implique que la tique porte en elle du sang de l'hôte pas encore

digéré. En conséquence, lorsque l'on détecte un agent pathogène dans notre échantillon de tique on ne peut exclure que l'agent pathogène au lieu d'être présent dans la tique, soit présent dans le repas sanguin. Cela pourrait expliquer la détection de *Mycoplasma wenyonii*, bactérie déjà décrite dans des bovins à Cuba, et qui pourrait donc être présente aussi dans les bovins des Antilles Françaises (Rodriguez *et al.*, 1989).

(2) La cohabitation des deux espèces de tiques. Les tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* parasitent toutes deux le bovin, et peuvent cohabiter sur le même animal, partageant ainsi le même repas sanguin. En Guadeloupe ces deux espèces de tiques ont très souvent été collectées sur le même animal. Cela implique que les agents pathogènes circulant dans le sang de l'animal peuvent se retrouver chez les deux espèces de tiques, mais cela n'implique pas forcément que les deux tiques soient capables d'acquérir et de retransmettre l'agent pathogène, donc d'être vectrice de l'agent pathogène détecté. Par exemple la détection inattendue de *Theileria mutans*, *Theileria velifera* et de *Rickettsia* spp. dans les *Rhipicephalus microplus* en Guadeloupe peut d'avantage être expliquée par le partage d'un repas de sang contaminé avec des *Amblyomma variegatum* infectées par ces agents pathogènes, plutôt qu'une potentielle compétence vectorielle de cette tique pour ces agents infectieux (Matsimbe *et al.*, 2017).

(3) La possibilité d'hôtes vertébrés secondaires impliqués dans les cycles épidémiologiques de ces agents pathogènes. *Amblyomma variegatum* est une tique à trois hôtes. Les adultes se fixent préférentiellement sur les bovins mais ont déjà été rapportés sur différents hôtes tels que les chevaux, les chèvres, les porcs, et les chiens (Barré *et al.*, 1988). En Guadeloupe, les stases immatures, les larves et les nymphes, peuvent également se nourrir sur des mangoustes et des oiseaux (Barré *et al.*, 1988). *Rhipicephalus microplus* est une tique à un hôte, qui est généralement considérée comme spécifique des hôtes bovins. Cependant cette tique est capable de parasiter d'autres animaux domestiques (dont le chien) et des animaux sauvages, dont les mangoustes, comme cela a été rapporté à Antigua (Corn *et al.*, 1994 ; de Miranda *et al.*, 2011 ; Rodriguez-Vivas *et al.*, 2013). Cela signifie que ces deux espèces de tiques, notamment *Amblyomma variegatum*, peuvent occasionnellement se nourrir sur des hôtes différents du bovin, et ainsi potentiellement acquérir des agents pathogènes de ces hôtes inhabituels (Baneth *et al.*, 2014).

### **Absence de *Coxiella* spp. au sein de nos échantillons ?**

Le séquençage avait permis d'identifier 43 séquences *Coxiella* spp. dont 41 étaient associées à des *Coxiella* like-endosymbiontes (CLEs) et deux à l'agent pathogène *Coxiella burnetii*. Bien

que deux sets d'amorces/sonde permettant la détection de *Coxiella burnetii* et de certaines CLEs soient inclus dans la puce de détection bactéries/parasites, aucune amplification n'a été détectée. Que *Coxiella burnetii* soit absent de nos échantillons n'est pas inattendu, par contre l'absence de détection de CLEs est très surprenante au vue des résultats du séquençage Illumina. Sachant que les CLEs composent un groupe génétiquement très diverse, formant plusieurs clades en fonction de l'espèce de tique hôte, il est fort possible que l'absence de détection soit due à un manque de spécificité des oligonucléotides pour les CLEs présentes dans les tiques *Amblyomma variegatum* et/ou *Rhipicephalus microplus* analysées (Duron *et al.*, 2015a). Ainsi, dans le cadre de futures recherches portant sur les CLEs présentes dans ces deux espèces de tiques, il faudra refaire de nouveaux oligonucléotides spécifiques des espèces symbiotiques présentes.

### **Situation épidémiologie des virus détectés dans les tiques des Antilles Françaises**

#### **Absence de virus d'intérêt médical et vétérinaire dans les tiques des Antilles Françaises.**

Aucun des 22 virus d'intérêt médical ou vétérinaire ciblés dans cette étude n'a été détecté. A la différence des bactéries et des parasites, les virus connus pour être transmis par *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus*, tels que le virus Thogoto ou le virus Dugbe, ne semblent pas avoir été introduits dans les Caraïbes avec leur vecteur (Labuda and Nuttall, 2004). Ainsi les résultats obtenus à l'aide de la puce détection rejoignent ceux du séquençage Illumina, les deux espèces de tiques collectées dans les Antilles Françaises ne semblent pas être infectées par des virus d'intérêt sanitaire (Figure 2). Ces résultats ne sont pas surprenant au vue de l'absence de rapport de maladies virales associées aux tiques depuis plusieurs décennies, outre les cas particuliers de la Peste Porcine Africaine rapportés dans les années 1970s dans les Caraïbes (Costard *et al.*, 2009 ; Gondard *et al.*, 2017).

#### **Suivi des nouveaux virus identifiés en séquençage Illumina dans les échantillons de tiques individuelles des Antilles Françaises.**

Les quatre nouveaux virus identifiés en séquençage Illumina ont bien été retrouvés au sein de nos échantillons de tiques (Figure 2). Les arthropodes, dont les tiques, abritent une importante diversité virale, qui reste encore à l'heure actuelle très peu étudiée, la majorité des

virus analysés étant ceux qui se révèlent pathogènes pour l'homme ou l'animal (Li *et al.*, 2015). Ces nouveaux virus décrits récemment présentent des structures génomiques et une organisation génétique très variables, parfois nouvelles, et se placent phylogénétiquement entre des familles et des genres connus, révélant ainsi des liens évolutifs complexes. L'analyse phylogénétique de ces virus montre que la classification virale actuelle est loin de représenter toute la biodiversité des arbovirus (Li *et al.*, 2015 ; Shi *et al.*, 2016). Sachant que les tiques semblent jouer un rôle clé dans l'évolution des virus, notamment les virus à ARN, permettant les interactions et les échanges génétiques au sein de leur « virosphère », il semble primordial de caractériser ces nouveaux virus (Li *et al.*, 2015 ; Shi *et al.*, 2016).

Ainsi nous avons voulu étudié la répartition et le taux d'infection de ces nouveaux virus au sein de nos échantillons de tiques de Guadeloupe et de Martinique. Notre étude constitue la première évaluation du taux d'infection de ces virus dans des échantillons de tique individuelle.

Le Changping tick-virus-Like (CTVL) et le Wuhan tick virus-Like (WTVL) sont tous deux des Chuvirus, et présentent un génome ARN non segmenté, circulaire, à trois ORF (ARN polymérase – Glycoprotéine – Nucléoprotéine). Les Chuvirus se placent phylogénétiquement à une place intermédiaire entre les virus ARN segmentés et les non segmentés (Li *et al.*, 2015).

Le CTVL partage 55,6% d'identité de séquence avec le Changping tick virus 2 décrit en Chine dans des *Dermacentor* sp, et est ainsi considéré comme un nouveau virus. Le CTVL a été retrouvé dans 24,1% des tiques *Amblyomma variegatum*, et dans 0,6-1,2% des *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe. Le WTVL partage 94.3% d'identité de séquence avec le Wuhan tick virus 2 décrit en Chine dans des *Rhipicephalus microplus*, et constitue ainsi un nouveau variant (génotype) caribbéen. Le WTVL a été retrouvé de façon significative dans les deux espèces de tiques : dans 14,6% des *Amblyomma variegatum* et 24,1% et 92,5-94% des *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et Martinique.

Le Jingmenvirus-Like (JVL) fait partie des Jingmenvirus, un groupe de virus présentant des génomes ARN segmentés, majoritairement à 4 segments, qui partagent une ascendance commune avec les *Flaviviridae* (virus à ARN non segmentés). Ces virus ont été décrits chez différents arthropodes (moustique, tique, etc...) et récemment chez un primate (Shi *et al.*, 2015 ; Ladner *et al.*, 2016). Le JVL partage globalement 80% d'identité de séquence, pour chacun des quatre segments, avec le Jingmen Tick Virus et le Mogiana Tick Virus, respectivement décrits dans des échantillons de *Rhipicephalus microplus* de Chine et du Brésil (Qin *et al.*, 2014 ; Maruyama *et al.*, 2014 ; Villa *et al.*, 2017), et constitue ainsi un

nouveau membre des Jingmenvirus. Le JVL a été globalement retrouvé dans 5,1% des *Amblyomma variegatum*, 24,7-42,2 % et 76,9-78,6% des *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et Martinique (taux d'infection du segment 4). En fonction des segments recherchés nous n'avons pas obtenu les mêmes taux d'infection suggérant une expression différentielle des segments viraux. Le segment 1 codant l'ARNr polymérase semble être moins exprimé, par rapport au segments 2 et 4 qui codent les protéines de structure ce qui est semblable à ce qui se passe pour certain virus de la famille des *Bunyaviridae* (Gauliard *et al.*, 2006).

Le Lihan tick virus-Like (LTVL) fait partie des phlébovirus, qui regroupent des virus ARN à trois segments, avec le Segment L codant la polymérase, le segment M les glycoprotéines et le segment S la protéine de nucléocapside (Elliott and Brennan, 2014). Le LTV partage 95,1% et 96,7 % d'identité de séquences nucléotidiques avec les segments L et S du Lihan tick virus décrit dans des échantillons de *Rhipicephalus microplus* de Chine (Li *et al.*, 2015), et constitue ainsi un nouveau variant (ou génotype) de ce genre viral. Néanmoins la classification du LTVL en tant que phlébovirus nécessite de plus amples confirmations à cause de (1) l'absence du segment M, que ce soit dans cette étude ou dans l'étude chinoise (Li *et al.*, 2015). Néanmoins on ne peut exclure que les segments M de ces nouveaux virus soient tellement polymorphes que leur identification par recherche d'identité de séquence soit impossible. (2) l'absence des séquences clés des *Phlebovirus* normalement présentes en 5'-UTR (ACACAAAG) et 3'-UTR (CUUUGUGU = CTTTGTGT) (Elliott and Brennan, 2014). Cependant, sachant que l'on a reconstruit *in silico* les séquences des segments L et S, et malgré l'obtention des ORF, on ne peut exclure que ces séquences soient incomplètes. (3) l'absence de l'ORF de type NSs sur le segment S. Néanmoins, une adaptation spécifique du LTVL à son vecteur arthropode pourrait expliquer la perte du facteur de virulence lié à l'ORF NSs, comme cela a été démontré pour le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (Moutailler *et al.*, 2011). Le LTVL a été globalement retrouvé dans 12,4% des *Amblyomma variegatum*, 65,1-94,6 % et 90,7-92,5% des *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et Martinique (taux d'infection du segment S).

Globalement, l'analyse épidémiologique des résultats des taux d'infection de ces virus dans nos échantillons de tique est limitée de par la nature de l'échantillonnage des tiques. En effet, la collecte de tiques gorgées, et provenant parfois du même animal, inclut un biais de détection dû à la présence potentielle des virus dans le sang de l'hôte. Cependant plusieurs questions ont pu être soulevées suite à l'analyse de nos résultats.

(1) Les virus présentent-ils une spécificité de vecteur ? Les taux d'infection du CTVL et du JTV entre les deux espèces de tiques sont très différents, suggérant que le CTVL pourrait être plus spécifique des tiques *Amblyomma variegatum*, et le JTV des *Rhipicephalus microplus*. D'autant que l'espèce de tique qui présente un taux d'infection faible a généralement été collectée sur le même animal que l'espèce de tique présentant un taux d'infection élevé. Par contre, le WTVL et le LTVL semblent pouvoir infecter les deux espèces de tiques. En regard du biais de détection lié à la présence de sang de l'hôte dans les tiques analysées, seules des études de compétence vectorielle permettraient l'identification formelle d'une espèce de tique vectrice.

(2) Ces virus circulent-ils chez les vertébrés, notamment le bovin ? Si l'hypothèse d'une contamination virale via le repas sanguin d'une des deux espèces de tiques, qui ne serait pas vectrice, se confirme, cela signifie que le virus circule à un moment donné dans le sang du bovin. Ceci pourrait donc suggérer que soit le virus est capable de se répliquer chez le vertébré, qui une fois devenu virémique, transmettrait l'infection à la tique lors du repas sanguin ; soit que le virus serait transmis par « co-feeding », une tique infectée transférerait le virus à une autre tique non infectée qui se nourrirait à proximité via le site de gorgement, sans que l'hôte vertébré ne développe de virémie (Kazimírová *et al.*, 2017). Parmi les virus étudiés dans cette étude, le JVL et le LTVL font partie respectivement des groupes des Jingmenvirus et des phlébovirus qui comprennent des virus capable de se répliquer chez les vertébrés (Palacios *et al.*, 2013 ; Ladner *et al.*, 2016 ; Villa *et al.*, 2017). Ainsi, il serait particulièrement intéressant de rechercher ces virus dans le sang de vertébrés, notamment celui des bovins qui font partie intégrante du cycle de vie des tiques étudiées dans les Antilles Françaises. Cela permettrait d'une part de déterminer si ces virus sont capables de se répliquer chez les vertébrés, et d'autre part d'identifier de potentiels réservoirs.

(3) Ces virus sont-ils intégrés au génome de la tique ? Sachant que nous travaillons uniquement sur des données issues de séquençage Illumina, et que nous avons détecté ponctuellement les quatre nouveaux virus au sein des échantillons d'ADN des tiques de Guadeloupe et de Martinique, l'origine endogène potentielle de ces virus doit être vérifiée. Bien que les séquences virales endogènes soient généralement décrites comme des pseudogènes non fonctionnels ou de l'ADN fossile, certains EVEs codent des ORF intacts, capables d'être exprimés (Katzourakis and Gifford, 2010). Ceci peut être lié soit à une endogénéisation récente du génome viral dans le génome hôte, soit à une exaptation (sélection positive) de l'EVE au cours de l'évolution du génome hôte (Katzourakis and Gifford, 2010). Ainsi, sachant que nous avons obtenu des séquences ORF complètes pour chacun des

nouveaux virus décrits en NGS, si ces virus présentent des formes endogènes, cela induirait soit une intégration virale récente, soit une sélection et un rôle biologique potentiel de ces séquences virales actives au sein du génome de la tique. Néanmoins, la présence de contaminant ARN dans les échantillons ADN dû à une extraction commune des acides nucléiques pourraient également expliquer la détection de ces virus. En conclusion, seul l'isolement de ces virus pourra nous permettre de déterminer la présence de virus exogènes ou endogènes.

Finalement, outre les risques sanitaires potentiels de ces virus pour l'Homme et l'animal qui nous incite à les rechercher plus activement, ces virus semblent faire partie du microbiome de la tique, à l'instar des bactéries endosymbiotiques, et pourraient donc avoir un impact sur la biologie de la tique et sur sa capacité à transmettre des agents pathogènes (Narasimhan and Fikrig 2015). Caractériser les interactions entre ces virus et leurs vecteurs permettrait éventuellement de trouver de nouvelles pistes de contrôle des maladies à tiques transmis par *Rhipicephalus microplus* et *Amblyomma variegatum*.

En conclusion, dans cette étude nous avons développé des outils d'investigation épidémiologique à haut débit permettant la surveillance en temps réel et concomitante d'un large panel d'agents pathogènes et microorganismes présents dans les tiques caribéennes. Cet outil, bien que limité à des fins de recherche et non de diagnostic, offre l'opportunité d'explorer en un temps très court la diversité en agents pathogènes et microorganismes d'intérêts au sein d'échantillon biologique. L'analyse des tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus* de Guadeloupe et de Martinique a révélé une diversité en agents pathogènes et microorganismes supérieure à celle qui pouvait être attendue d'après les données de la littérature. Les résultats obtenus ont démontré la présence d'agents pathogènes attendus, inattendus et nouveaux, la plupart en co-infection au sein de nos échantillons de tiques. Ces résultats apportent de nouvelles perspectives de recherche sur les tiques et les agents pathogènes dans les Caraïbes, telle que la caractérisation des espèces de *Borrelia* et d'*Ehrlichia* nouvellement détectées, ou encore la caractérisation des nouveaux virus décrits dans cette étude.

Finalement, l'analyse des échantillons de tiques collectées à travers les Caraïbes à l'aide des outils d'investigation épidémiologique développés dans cette étude nous permettra d'explorer la diversité microbienne des tiques et nous permettra ainsi d'estimer les risques en santé humaine et vétérinaire liés aux maladies à tiques dans la région.



# REFERENCES

- Aguiar, D. M., Ziliani, T. F., Zhang, X., Melo, A. L. T., Braga, I. A., Witter, R., et al. (2014). A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 537–544. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.03.010.
- Ahantarig, A., Trinachartvanit, W., Baimai, V., and Grubhoffer, L. (2013). Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens). *Folia Microbiol. (Praha)* 58, 419–428. doi:10.1007/s12223-013-0222-1.
- Aitken, T. H. G., Jonkers, A. H., Tikasingh, E. S., and Worth, C. B. (1968). Hughes Virus From Trinidadian Ticks And Terns. *J Med Entomol* 5, 501–503. doi:10.1093/jmedent/5.4.501.
- Andreotti, R., Pérez de León, A. A., Dowd, S. E., Guerrero, F. D., Bendele, K. G., and Scoles, G. A. (2011). Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol.* 11, 6. doi:10.1186/1471-2180-11-6.
- Baneth, G. (2014). Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. *International Journal for Parasitology* 44, 591–596. doi:10.1016/j.ijpara.2014.03.011.
- Barre, N., Garris, G. I., Borel, G., and Camus, E. (1988). Hosts and Population Dynamics of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) on Guadeloupe, French West Indies. *J Med Entomol* 25, 111–115. doi:10.1093/jmedent/25.2.111.
- Barré, N., and Uilenberg, G. (2010). Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 29, 149–160, 135–147.
- Barré, N., Uilenberg, G., Morel, P. C., and Camus, E. (1987). Danger of introducing heartwater onto the American mainland: potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54, 405–417.
- Beati, L., Patel, J., Lucas-Williams, H., Adakal, H., Kanduma, E. G., Tembo-Mwase, E., et al. (2012). Phylogeography and demographic history of *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), the tropical bont tick. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 514–525. doi:10.1089/vbz.2011.0859.
- Bell-Sakyi, L., and Attoui, H. (2013). Endogenous tick viruses and modulation of tick-borne pathogen growth. *Front Cell Infect Microbiol* 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00025.
- Berggoetz, M., Schmid, M., Ston, D., Wyss, V., Chevillon, C., Pretorius, A.-M., et al. (2014). Tick-borne pathogens in the blood of wild and domestic ungulates in South Africa: Interplay of game and livestock. *Ticks and Tick-borne Diseases* 5, 166–175. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.10.007.
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., and Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129 Suppl, S247-269.

- Bonnet, S., Michelet, L., Moutailler, S., Cheval, J., Hébert, C., Vayssier-Taussat, M., et al. (2014). Identification of Parasitic Communities within European Ticks Using Next-Generation Sequencing. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2753. doi:10.1371/journal.pntd.0002753.
- Boulanger, N. and McCoy, K. D. (2017). Chapitre 25. Les tiques (Acari : Ixodida). *Entomologie médicale et vétérinaire*. Marseille: IRD. 553-596p.
- Burbelo, P. D., Lebovitz, E. E., and Notkins, A. L. (2015). Luciferase Immunoprecipitation Systems for Measuring Antibodies in Autoimmune and Infectious Diseases. *Transl Res* 165, 325–335. doi:10.1016/j.trsl.2014.08.006.
- Burger, T. D., Shao, R., Labruna, M. B., and Barker, S. C. (2014). Molecular phylogeny of soft ticks (Ixodida: Argasidae) inferred from mitochondrial genome and nuclear rRNA sequences. *Ticks and Tick-borne Diseases* 5, 195–207. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.10.009.
- Cabezas-Cruz, A., Zweggarth, E., Vancová, M., Broniszewska, M., Grubhoffer, L., Passos, L. M. F., et al. (2016). *Ehrlichia minasensis* sp. nov., a new species within the genus *Ehrlichia* isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi:10.1099/ijsem.0.000895.
- Camus, E., and Barre, N. (1995). Vector situation of tick-borne diseases in the Caribbean islands. *Veterinary Parasitology* 57, 167–176. doi:10.1016/0304-4017(94)03118-G.
- Camus, E., and Montenegro-James, S. (1994). Bovine anaplasmosis and babesiosis in the Lesser Antilles: risk assessment of an unstable epidemiologic situation. *Vet. Res.* 25, 313–317.
- Cheval, J., Sauvage, V., Frangeul, L., Dacheux, L., Guigon, G., Dumey, N., et al. (2011). Evaluation of high-throughput sequencing for identifying known and unknown viruses in biological samples. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3268–3275. doi:10.1128/JCM.00850-11.
- Corn, J. L., Kavanaugh, D. M., Creekmore, T. E., and Robinson, J. L. (1994). Wildlife as hosts for ticks (Acari) in Antigua, West Indies. *J. Med. Entomol.* 31, 57–61.
- Costard, S., Wieland, B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., et al. (2009). African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 2683–2696. doi:10.1098/rstb.2009.0098.
- Cutler, S. J., Ruzic-Sabljic, E., and Potkonjak, A. (2017). Emerging borreliae – Expanding beyond Lyme borreliosis. *Molecular and Cellular Probes* 31, 22–27. doi:10.1016/j.mcp.2016.08.003.
- Danielová, V., Marhoul, Z., Dusbábek, F., Ryba, J., Fernández, A., de la Cruz, J., et al. (1982). Isolation of Hughes virus from ticks in Cuba. *Acta Virol.* 26, 186–189.
- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors* 3, 26. doi:10.1186/1756-3305-3-26.

- de la Fuente, J., Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A. G., Estrada-Peña, A., et al. (2017). Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 114. doi:10.3389/fcimb.2017.00114.
- de Miranda, R. L., de Castro, J. R., Olegário, M. M. M., Beletti, M. E., Mundim, A. V., O'Dwyer, L. H., et al. (2011). Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. *Veterinary Parasitology* 177, 392–396. doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.044.
- Dugat, T., Lagrée, A.-C., Maillard, R., Boulouis, H.-J., and Haddad, N. (2015). Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Anaplasma phagocytophilum*, 61. doi:10.3389/fcimb.2015.00061.
- Duron, O., Noël, V., McCoy, K. D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., et al. (2015a). The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLOS Pathogens* 11, e1004892. doi:10.1371/journal.ppat.1004892.
- Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S., and Jourdain, E. (2015b). The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated? *Trends in Parasitology* 31, 536–552. doi:10.1016/j.pt.2015.06.014.
- Elliott, R. M., and Brennan, B. (2014). Emerging phleboviruses. *Curr Opin Virol* 5, 50–57. doi:10.1016/j.coviro.2014.01.011.
- Estrada-Peña, A. (2015). Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 34, 53–65.
- Estrada-Peña, A., Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., and Nijhof, A. M. (2013). Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats. *Front Cell Infect Microbiol* 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00029.
- Estrada-Peña, A., Mangold, A. J., Nava, S., Venzal, J. M., Labruna, M., and Guglielmone, A. A. (2010). A review of the systematics of the tick family Argasidae (Ixodida). *Acarologia* 50, 317–333. doi:10.1051/acarologia/20101975.
- Feschotte, C., and Gilbert, C. (2012). Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nat Rev Genet* 13, 283–296. doi:10.1038/nrg3199.
- Gauliard, N., Billecocq, A., Flick, R., and Bouloy, M. (2006). Rift Valley fever virus noncoding regions of L, M and S segments regulate RNA synthesis. *Virology* 351, 170–179. doi:10.1016/j.virol.2006.03.018.
- Guglielmone, A. A., and Nava, S. (2014). Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed

- names--with notes on confusions and misidentifications. *Zootaxa* 3767, 1–256.
- Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Pena, A., Shao, R., et al. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. Available at: <http://repository.up.ac.za/handle/2263/17278> [Accessed June 30, 2017].
- Hall, R. A., Bielefeldt-Ohmann, H., McLean, B. J., O'Brien, C. A., Colmant, A. M. G., Piyasena, T. B. H., et al. (2017). Commensal Viruses of Mosquitoes: Host Restriction, Transmission, and Interaction with Arboviral Pathogens. *Evol Bioinform Online* 12, 35–44. doi:10.4137/EBO.S40740.
- Holmes, E. C. (2011). The Evolution of Endogenous Viral Elements. *Cell Host & Microbe* 10, 368–377. doi:10.1016/j.chom.2011.09.002.
- Hou, J., Ling, F., Chai, C., Lu, Y., Yu, X., Lin, J., et al. (2015). Prevalence of *Borrelia burgdorferi Sensu Lato* in Ticks from Eastern China. *Am J Trop Med Hyg* 92, 262–266. doi:10.4269/ajtmh.14-0587.
- Jongejan, F., and Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl, S3-14.
- Jonkers, A. H., Casals, J., Aitken, T. H. G., and Spence, L. (1973). Soldado Virus, a New Agent from Trinidadian Ornithodoros Ticks. *Journal of Medical Entomology* 10, 517–519. doi:10.1093/jmedent/10.5.517.
- Katzourakis, A., and Gifford, R. J. (2010). Endogenous Viral Elements in Animal Genomes. *PLOS Genetics* 6, e1001191. doi:10.1371/journal.pgen.1001191.
- Kazimírová, M., and Štibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 43. doi:10.3389/fcimb.2013.00043.
- Kazimírová, M., Thangamani, S., Bartíková, P., Hermance, M., Holíková, V., Štibrániová, I., et al. (2017). Tick-Borne Viruses and Biological Processes at the Tick-Host-Virus Interface. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 339. doi:10.3389/fcimb.2017.00339.
- Kelly, P. J., Fournier, P.-E., Parola, P., and Raoult, D. (2003). A survey for spotted fever group rickettsiae and ehrlichiae in *Amblyomma variegatum* from St. Kitts and Nevis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 58–59.
- Kelly, P. J., Lucas, H., Ereemeeva, M. E., Dirks, K. G., Rolain, J. M., Yowell, C., et al. (2010a). *Rickettsia felis*, West Indies. *Emerg Infect Dis* 16, 570–571. doi:10.3201/eid1603.091431.
- Kelly, P., Lucas, H., Beati, L., Yowell, C., Mahan, S., and Dame, J. (2010b). *Rickettsia africae* in *Amblyomma variegatum* and domestic ruminants on eight Caribbean islands. *J. Parasitol.* 96, 1086–1088. doi:10.1645/GE-2552.1.

- Klompen, J. S. H., and Oliver, J. H. J. (Institute of A. and P. (1993). Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae). *Systematic Entomology (United Kingdom)*. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9502343> [Accessed August 17, 2017].
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., and Garcia-Garcia, J. C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 129 Suppl, S285-300.
- Kosoy, O. I., Lambert, A. J., Hawkinson, D. J., Pastula, D. M., Goldsmith, C. S., Hunt, D. C., et al. (2015). Novel Thogotovirus Associated with Febrile Illness and Death, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 21, 760–764. doi:10.3201/eid2105.150150.
- Krause, P. J., Fish, D., Narasimhan, S., and Barbour, A. G. (2015). *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clinical Microbiology and Infection* 21, 631–639. doi:10.1016/j.cmi.2015.02.006.
- Labuda, M., and Nuttall, P. A. (2004). Tick-borne viruses. *Parasitology* 129 Suppl, S221-245.
- Ladner, J. T., Wiley, M. R., Beitzel, B., Auguste, A. J., Dupuis, A. P., Lindquist, M. E., et al. (2016). A Multicomponent Animal Virus Isolated from Mosquitoes. *Cell Host Microbe* 20, 357–367. doi:10.1016/j.chom.2016.07.011.
- Laroche, M., Marie, J., Mediannikov, O., Almeras, L., Berenger, J.-M., Musso, D., et al. (2016). A novel ehrlichial agent detected in tick in French Polynesia. *Ticks Tick Borne Dis* 7, 1203–1208. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.07.014.
- Li, C.-X., Shi, M., Tian, J.-H., Lin, X.-D., Kang, Y.-J., Chen, L.-J., et al. (2015). Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife* 4. doi:10.7554/eLife.05378.
- Lynn, G. E., Oliver, J. D., Nelson, C. M., Felsheim, R. F., Kurtti, T. J., and Munderloh, U. G. (2015). Tissue Distribution of the *Ehrlichia muris*-Like Agent in a Tick Vector. *PLoS One* 10. doi:10.1371/journal.pone.0122007.
- Maggi, R. G., Compton, S. M., Trull, C. L., Mascarelli, P. E., Mozayeni, B. R., and Breitschwerdt, E. B. (2013). Infection with Hemotropic *Mycoplasma* Species in Patients with or without Extensive Arthropod or Animal Contact. *J Clin Microbiol* 51, 3237–3241. doi:10.1128/JCM.01125-13.
- Maina, A. N., Jiang, J., Omulo, S. A., Cutler, S. J., Ade, F., Ogola, E., et al. (2014). High Prevalence of *Rickettsia africae* Variants in *Amblyomma variegatum* Ticks from Domestic Mammals in Rural Western Kenya: Implications for Human Health. *Vector Borne Zoonotic Dis* 14, 693–702. doi:10.1089/vbz.2014.1578.
- Málková, D., Holubová, J., Cerný, V., Daniel, M., Fernández, A., de la Cruz, J., et al. (1985).

- Estero real virus: a new virus isolated from argasid ticks *Ornithodoros tadaridae* in Cuba. *Acta Virol.* 29, 247–250.
- Mans, B. J., Gothe, R., and Neitz, A. W. H. (2004). Biochemical perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. *Parasitology* 129 Suppl, S95-111.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9, 387–402. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.
- Maruyama, S. R., Castro-Jorge, L. A., Ribeiro, J. M. C., Gardinassi, L. G., Garcia, G. R., Brandão, L. G., et al. (2014). Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 38–50. doi:10.1590/0074-0276130166.
- Matsimbe, A. M., Magaia, V., Sanches, G. S., Neves, L., Noormahomed, E., Antunes, S., et al. (2017). Molecular detection of pathogens in ticks infesting cattle in Nampula province, Mozambique. *Exp Appl Acarol* 73, 91–102. doi:10.1007/s10493-017-0155-5.
- Matysiak, A., Dudko, P., Dudek, K., Dudek, M., Junkuszew, A., and Tryjanowski, P. (2016). The occurrence of pathogens in *Rhipicephalus microplus* ticks from cattle in Madagascar. *Veterinarni Medicina* 61, 516–523. doi:10.17221/59/2016-VETMED.
- McCown, M. E., Opel, T., and Grzeszak, B. (2013). Vector-borne disease surveillance in puerto rico: pathogen prevalence rates in canines ? Implications for public health and the u.s. Military ? Applying the one health concept. *J Spec Oper Med* 13, 59–63.
- McCoy, K. D., and Boulanger, N. (Eds.). (2015). Tiques et maladies à tiques : biologie, écologie évolutive, épidémiologie. Marseille: IRD. 344p.
- McCoy, B. N., Maïga, O., and Schwan, T. G. (2014). Detection of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus geigyi* from Mali. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 401–403. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.01.007.
- McCoy, K. D., Dietrich, M., Jaeger, A., Wilkinson, D. A., Bastien, M., Lagadec, E., et al. (2016). The role of seabirds of the Iles Eparses as reservoirs and disseminators of parasites and pathogens. *Acta Oecologica* 72, 98–109. doi:10.1016/j.actao.2015.12.013.
- Messick, J. B. (2004). Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol* 33, 2–13.
- Molad, T., Mazuz, M. L., Fleiderovitz, L., Fish, L., Savitsky, I., Krigel, Y., et al. (2006). Molecular and serological detection of *A. centrale*- and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. *Veterinary Microbiology* 113, 55–62. doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.026.
- Morel, P.-C. (1967). Etudes sur les tiques du bétail en Guadeloupe et Martinique. II. Agents pathogènes transmis par les tiques. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 20, 291–299. doi:10.19182/remvt.7508.

- Moutailler, S., Popovici, I., Devillers, E., Vayssier-Taussat, M., and Eloit, M. (2016). Diversity of viruses in *Ixodes ricinus*, and characterization of a neurotropic strain of Eyach virus. *New Microbes and New Infections* 11, 71–81. doi:10.1016/j.nmni.2016.02.012.
- Moutailler, S., Roche, B., Thiberge, J.-M., Caro, V., Rougeon, F., and Failloux, A.-B. (2011). Host alternation is necessary to maintain the genome stability of rift valley fever virus. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1156. doi:10.1371/journal.pntd.0001156.
- Narasimhan, S., and Fikrig, E. (2015). Tick microbiome: the force within. *Trends Parasitol* 31, 315–323. doi:10.1016/j.pt.2015.03.010.
- Padgett, K. A., Bonilla, D., Eremeeva, M. E., Glaser, C., Lane, R. S., Porse, C. C., et al. (2016). The Eco-epidemiology of Pacific Coast Tick Fever in California. *PLoS Negl Trop Dis* 10. doi:10.1371/journal.pntd.0005020.
- Palacios, G., Savji, N., Rosa, A. T. da, Guzman, H., Yu, X., Desai, A., et al. (2013). Characterization of the Uukuniemi Virus Group (Phlebovirus: Bunyaviridae): Evidence for Seven Distinct Species. *J. Virol.* 87, 3187–3195. doi:10.1128/JVI.02719-12.
- Parola, P., Jourdan, J., and Raoult, D. (1998). Tick-borne infection caused by *Rickettsia africae* in the West Indies. *N. Engl. J. Med.* 338, 1391. doi:10.1056/NEJM199805073381918.
- Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., et al. (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 657–702. doi:10.1128/CMR.00032-13.
- Parola, P., and Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32, 897–928. doi:10.1086/319347.
- Parola, P., Vestris, G., Martinez, D., Brochier, B., Roux, V., and Raoult, D. (1999). Tick-borne rickettsiosis in Guadeloupe, the French West Indies: isolation of *Rickettsia africae* from *Amblyomma variegatum* ticks and serosurvey in humans, cattle, and goats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 888–893.
- Pérez-Eid, C. (2007). Les Tiques: Identification, Biologie, Importance Médicale et Vétérinaire. Paris: Lavoisier. 339p
- Pérez-Osorio, C. E., Zavala-Velázquez, J. E., León, J. J. A., and Zavala-Castro, J. E. (2008). *Rickettsia felis* as Emergent Global Threat for Humans. *Emerg Infect Dis* 14, 1019–1023. doi:10.3201/eid1407.071656.
- Pettersson, J. H.-O., Shi, M., Bohlin, J., Eldholm, V., Brynildsrud, O. B., Paulsen, K. M., et al. (2017). Characterizing the virome of *Ixodes ricinus* ticks from northern Europe. *Sci Rep* 7, 10870. doi:10.1038/s41598-017-11439-y.
- Qablan, M. A., Kubelová, M., Šíroky, P., Modrý, D., and Amr, Z. S. (2012). Stray dogs of northern Jordan as reservoirs of ticks and tick-borne hemopathogens. *Parasitol Res* 111, 301–307. doi:10.1007/s00436-012-2839-4.



- Qin, X.-C., Shi, M., Tian, J.-H., Lin, X.-D., Gao, D.-Y., He, J.-R., et al. (2014). A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 6744–6749. doi:10.1073/pnas.1324194111.
- Raoult, D., Fournier, P. E., Fenollar, F., Jensenius, M., Prie, T., de Pina, J. J., et al. (2001). *Rickettsia africae*, a Tick-Borne Pathogen in Travelers to Sub-Saharan Africa. *New England Journal of Medicine* 344, 1504–1510. doi:10.1056/NEJM200105173442003.
- Rar, V., and Golovljova, I. (2011). *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus* Neoehrlichia” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1842–1861. doi:10.1016/j.meegid.2011.09.019.
- Robinson, J. B., Ereemeeva, M. E., Olson, P. E., Thornton, S. A., Medina, M. J., Sumner, J. W., et al. (2009). New approaches to detection and identification of *Rickettsia africae* and *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) ticks from the Caribbean. *J. Med. Entomol.* 46, 942–951.
- Rodriguez O.N., Espaine, L., Rivas, A., and Rodriguez, P.. (1989). Epidemiology of cattle diseases caused by haemoparasites in Cuba. Available at: <http://www.cabi.org/isc/abstract/19902200923> [Accessed March 25, 2017].
- Rodríguez-Vivas, R. I., Ojeda-Chi, M. M., Rosado-Aguilar, J. A., Trinidad-Martínez, I. C., Torres-Acosta, J. F. J., Ticante-Perez, V., et al. (2013). Red deer (*Cervus elaphus*) as a host for the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. *Exp. Appl. Acarol.* 60, 543–552. doi:10.1007/s10493-013-9672-z.
- Ruiz-López, M. J., Chaskelson, S., Gompper, M. E., and Eggert, L. S. (2012). Multiple paternity in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *J. Parasitol.* 98, 498–501. doi:10.1645/GE-2977.1.
- Rymaszewska, A., and Grenda, S. (2008). Bacteria of the genus *Anaplasma* - characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina - UZPI (Czech Republic)*. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CZ2009000584> [Accessed December 15, 2015].
- Shi, M., Lin, X.-D., Tian, J.-H., Chen, L.-J., Chen, X., Li, C.-X., et al. (2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature* 540, 539–543. doi:10.1038/nature20167.
- Shi, M., Lin, X.-D., Vasilakis, N., Tian, J.-H., Li, C.-X., Chen, L.-J., et al. (2015). Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses. *J Virol* 90, 659–669. doi:10.1128/JVI.02036-15.
- Šimo, L., Kazimirova, M., Richardson, J., and Bonnet, S. I. (2017). The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol* 7. doi:10.3389/fcimb.2017.00281.
- Smith, R. D., Brener, J., Osorno, M., and Ristic, M. (1978). Pathobiology of *Borrelia theileri* in the tropical cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 32, 182–

190. doi:10.1016/0022-2011(78)90028-9.
- Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.). (2014a) 2nd Revised edition. *Biology of Ticks, I*. New York : Oxford University Press.557p.
- Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.). (2014b). 2nd Revised edition. *Biology of Ticks, II*. New York : Oxford University Press.
- Uilenberg, G. (2006). Babesia--a historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3–10. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.035.
- Vachiéry, N., Jeffery, H., Pegram, R., Aprelon, R., Pinarello, V., Kandassamy, R. L. Y., et al. (2008). *Amblyomma variegatum* ticks and heartwater on three Caribbean Islands. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 191–195. doi:10.1196/annals.1428.081.
- Vannier, E., Gewurz, B. E., and Krause, P. J. (2008). Human Babesiosis. *Infect Dis Clin North Am* 22, 469–ix. doi:10.1016/j.idc.2008.03.010.
- Vayssier-Taussat, M., Moutailler, S., Michelet, L., Devillers, E., Bonnet, S., Cheval, J., et al. (2013). Next Generation Sequencing Uncovers Unexpected Bacterial Pathogens in Ticks in Western Europe. *PLoS ONE* 8, e81439. doi:10.1371/journal.pone.0081439.
- Vial, L. (2009). Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite* 16, 191–202.
- Villa, E. C., Maruyama, S. R., de Miranda-Santos, I. K. F., Palacios, G., and Ladner, J. T. (2017). Complete Coding Genome Sequence for Mogiana Tick Virus, a Jingmenvirus Isolated from Ticks in Brazil. *Genome Announc* 5. doi:10.1128/genomeA.00232-17.
- Walker, A. R., Bouattour, A., Camicas, J.-L., Estrada-Pena, A., Horak, I. G., Latif, A. A., et al. (2003). *Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species*. illustrée. Wisconsin University- Madison: Bioscience Reports Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015039701> [Accessed August 2, 2017].
- Yabsley, M. J., McKibben, J., Macpherson, C. N., Cattán, P. F., Cherry, N. A., Hegarty, B. C., et al. (2008). Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Vet. Parasitol.* 151, 279–285. doi:10.1016/j.vetpar.2007.11.008.
- Zhang, J., Kelly, P., Li, J., Xu, C., and Wang, C. (2015). Molecular Detection of *Theileria* spp. in Livestock on Five Caribbean Islands. *BioMed Research International* 2015, e624728. doi:10.1155/2015/624728.

# **ANNEXES**

## ANNEXE 1 Informations sur la collecte de tique sur Bovins en Guadeloupe

Origine des 312 tiques collectées en Guadeloupe. Au total, les tiques ont été prélevées sur 40 animaux provenant de 22 élevages. 10 animaux sont commun à la collecte de tiques *Amblyomma variegatum* et *Rhipicephalus microplus*.

Localité	Coordonnées GPS de latitude	Coordonnées GPS de longitude	Date de collecte	Identification Animal	Nombre de tique <i>Amblyomma variegatum</i>	Nombre de tique <i>Rhipicephalus microplus</i>
Sainte Anne	16,229172	-61,392648	41694	8101	19	0
	16,229172	-61,392648	41694	1915	2	9
				0822	7	9
	16,229172	-61,392648	41694	6676	1	0
Petit Bourg	16,188509	-61,592197	41709	01	11	0
				3243	9	5
	16,188509	-61,592197	41709	7243	4	1
				6575	13	0
	16,188509	-61,592197	41709	01	1	0
				02	4	0
Capesterre	16,02937	-61,61407	41716	2330	9	0
				02	1	2
	16,05847	-61,58963	41716	0678	2	16
				8195	6	3
	16,06136	-61,57392	41716	9414	3	5
				5386	0	7
Gosier	16,20603	-61,45411	41900	1968	11	3
				1562	7	0

Localité	Coordonnées GPS de latitude	Coordonnées GPS de longitude	Date de collecte	Identification Animal	Nombre de tique <i>Amblyomma variegatum</i>	Nombre de tique <i>Rhipicephalus microplus</i>
	16,23176	-61,49714	41900	7445	1	0
				2	3	0
	16,22066	-61,43132	41900	3281	2	0
Pointe Noire	16,213954	-61,760845	41901	7456	2	0
				1306	2	0
				5650	4	0
				5642	2	0
	16,213954	-61,760845	41901	3611	2	0
				179	1	0
Abymes	16,252217	-61,2966	42023	02	2	0
	16,26878	-61,505986	42023	9349	0	11
				02	0	6
	16,268897	-61,494389	42025	7310	0	18
				7306	0	32
	16,271093	-61,525283	ND	3	0	2
Morne à l'Eau	16,328297	-61,478572	42023	1733	0	6
				819	0	2
	16,31117	-61,49353	42025	9721	0	19
				2	0	7
	16,31117	-61,49353	42025	8272	2	12
Bouillante	16,129425	-61,768536	42029	0586	3	0
				01	1	0
Total de tique					137	175

## ANNEXE 2 Informations sur la collecte de tique sur Bovins en Martinique

**Origine des 285 tiques *Rhipicephalus microplus* collectées en Martinique. Au total, les tiques ont été prélevées sur 29 animaux provenant de 29 élevages.**

Localité	Coordonnées GPS de latitude	Coordonnées GPS de longitude	Date de collecte	Identification Animal	Nombre de tique <i>Rhipicephalus microplus</i>
Rivière Pilote	14,51638757	-60,87675966	14/02/2015	11AE	4
Le Diamant	14,47751	-61,0371	23/02/2015	23GC	1
Le François	14,65328	-60,90813	28/02/2015	40BW	51
Le François	14,62461	-60,92474	28/02/2015	40AA	2
Le Lamentin	14,61288	-60,96551	13/03/2015	32AL	2
Le Lorrain	14,8280197	-61,06688728	20/02/2015	14SAR	5
Le Morne Vert	14,70172	-61,15915	19/02/2015	26GRM	3
Le Robert	14,69237918	-60,92121708	10/02/2015	31OR	47
Le Robert	14,69569	-60,96376	17/02/2015	31MMC	3
Le Robert	14,65506	-60,91576	09/03/2015	31HG	6
Le Robert	14,68308	-60,94931	18/03/2015	31BG	1
Le Vauclin	14,5297	-60,83488	04/03/2015	80MMA	12
Le Vauclin	14,52472	-60,83864	03/03/2015	80DN	6
Le Vauclin	14,51985	-60,8484	09/03/2015	80PG	3
Le Vauclin	14,50589255	-60,84269546	09/02/2015	80RJ	4
Le Vauclin	14,54030812	-60,86447315	11/02/2015	80CNR	2
Le Vauclin	14,55967513	-60,83611679	27/03/2015	80HDG	5

Localité	Coordonnées GPS de latitude	Coordonnées GPS de longitude	Date de collecte	Identification Animal	Nombre de tique <i>Rhipicephalus microplus</i>
Le Vauclin	14,56447	-60,85533	19/02/2015	80AG	3
Le Vauclin	14,545633	-60,83913	19/03/2015	80HLC	5
Rivière salée	14,519436	-60,965645	19/02/2015	305657	3
Saint Esprit	14,57216	-60,93028	13/03/2015	70MG	28
Saint joseph	14,6528	-61,0422	12/03/2015	12MB	7
Saint joseph	14,66486	-61,01588	13/03/2015	12RDMJ	6
Sainte Anne	14,42659	-60,86205	22/04/2015	27AJP	3
Sainte Anne	14,42614	-60,87405	13/03/2015	27ZB	8
Sainte Anne	14,4359	-60,86584	20/03/2015	27OJ	18
Sainte Anne	14,4918	-60,96596	23/03/2015	28LLG	3
Sainte luce	14,49154	-60,94309	17/03/2015	28SD	36
Sainte Marie	14,79659	-61,01393	28/02/2015	30BJH	8
				Total de tique	285

## **ANNEXE 3 Règles de développement des sondes et amorces utilisées en PCR en temps réel microfluidique à haut débit**

### **Développement des Amorces :**

- Taille : 18 à 22 nucléotides
- Température d'hybridation (T<sub>m</sub>) : 60°C (concentration en sel ajustée)  
Vérification à l'aide du logiciel « Oligo Calculator version 3.27 » :  
<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>
- Pourcentage GC : entre 40 et 60%
- Eviter les successions de bases de plus de quatre répétitions (ex : AAAAA)
- Extrémité 3' en G ou C
- Eviter les successions de G
- La présence de Gs et de Cs dans les cinq dernières bases de l'amorce (extrémité 3') favorise les liaisons spécifiques, toutefois il faut éviter de mettre plus de trois Gs ou Cs.

#### *Conseils :*

- Il est possible d'améliorer l'efficacité d'amplification en ajoutant des Cs ou des Gs à l'extrémité 5' de l'amorce.
- La stabilité de l'extrémité 3' de l'amorce est essentielle, il ne faut pas introduire de mésappariements à ce niveau.

### **Développement des Sondes :**

- Taille : 18 à 32 nucléotides
- Température d'hybridation (T<sub>m</sub>) : 70°C (concentration en sel ajustée)  
Vérification à l'aide du logiciel « Oligo Calculator version 3.27 » :  
<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>  
NB : La T<sub>m</sub> de la sonde doit être supérieur de 8 à 10°C à la T<sub>m</sub> des amorces
- Sélectionner le brin qui fournit le plus de Cs que de Gs
- Eviter les successions de G
- Pas plus de 3 Gs ou Cs dans les cinq dernières bases
- La séquence sonde doit être collée à l'extrémité 3' de l'une des deux amorces
- Pas de G à l'extrémité 5' de la sonde : la base G bloque le fluorochrome FAM (6-carboxyfluorescein), et empêche ainsi l'émission du signal de détection en PCR en temps réel.

#### *Conseils :*

- Si la région ciblée par les amorces est trop petite, la séquence de la sonde peut chevaucher la séquence de l'amorce sur le brin complémentaire.
- Pour augmenter la spécificité de la sonde, ou si la séquence sonde est trop courte, possibilité d'ajouter à l'extrémité 3' des modifications telles que les LNA (locked nucleic acids) ou MGB (minor groove binder).
- Les sondes modifiées doivent avoir une taille entre 15 et 18 nucléotides

**Amplicon :** Taille optimale entre 70 et 200pb.



## Résumé de la thèse

Les maladies à transmission vectorielle sont dues à des agents pathogènes transmis par des arthropodes hématophages. Ces vecteurs assurent une transmission active (mécanique ou biologique) d'un agent infectieux d'un vertébré vers un autre vertébré. A l'échelle mondiale, les tiques sont responsables de la transmission de la plus grande variété d'agents pathogènes, elles transmettent des microorganismes responsables de maladies bactériennes (borréliose de Lyme, rickettsioses) ou parasitaires (babésioses, theilérioses), ou même virales (encéphalite à tiques).

Les Antilles se situent au cœur de la zone Néotropicale des Caraïbes, et constituent une zone à risque pour l'émergence de maladies vectorielles en raison des conditions climatiques favorables aux vecteurs et des échanges intercontinentaux importants (flux illégal d'animaux, oiseaux migrateurs,...). La situation épidémiologique de la zone Caraïbe vis-à-vis des maladies transmises par les tiques est très peu documentée. Les études menées sur le terrain portent essentiellement sur des agents pathogènes affectant les animaux comme *Ehrlichia ruminantium*, *Babesia* (*bovis* et *bigemina*) et *Anaplasma marginale* et sont donc loin de pouvoir répondre aux questions concernant le risque d'émergence ou de réémergence de maladies à tique. Ainsi, il est nécessaire et urgent de développer des outils efficaces de surveillance épidémiologique qui permettraient la détection des agents pathogènes, nouveaux, connus ou non suspectés présents dans les tiques.

C'est dans ce contexte d'amélioration des performances de veille sanitaire des maladies à tiques dans les Caraïbes que prend place le projet de thèse. La visée de la thèse était de faire un état des lieux des agents pathogènes d'intérêt médical et vétérinaire présents dans les tiques caribéennes à l'aide de techniques de détection à haut débit. Pour cela nous avons d'abord réalisé un séquençage à haut débit d'ARN extraits de tiques collectées en Guadeloupe et en Martinique afin de réaliser un inventaire sans *a priori* des agents pathogènes (bactéries, parasites, et virus) présents. Cette analyse a permis de mettre en évidence une grande diversité en microorganismes pathogènes au sein de nos échantillons, révélant également la présence de quatre virus appartenant à de nouveaux genres viraux récemment décrits et associés aux arthropodes. Les informations obtenues via le séquençage, additionnées aux données disponibles dans la littérature ont permis de constituer ainsi une liste des agents pathogènes transmis par les tiques nécessitant une surveillance sanitaire dans les caraïbes. A partir de ce répertoire nous avons développé un système de dépistage à haut-débit d'agents infectieux applicable à toute la zone des caraïbes. L'outil de détection est un support microfluidique de type puce à ADN, basé sur la technologie BioMark™ dynamic arrays (Fluidigm Corporation) qui permet de réaliser de la PCR en temps réel à haut débit afin de détecter simultanément 48 à 96 cibles au sein de 48 à 96 échantillons. Deux puces ont été développées, une première pour le suivi des bactéries et parasites, et une deuxième pour le suivi des virus. Leur performance a été testée sur des échantillons de tiques collectées en Guadeloupe et en Martinique. Ce dépistage à grande échelle a donné un aperçu complet de la situation épidémiologique de 45 bactéries, 17 parasites and 31 virus potentiellement transmis par les tiques dans les Antilles Françaises.

La méthode de surveillance développée durant cette thèse représente une amélioration majeure des techniques de veille épidémiologique, permettant la détection rapide et concomitante d'un large panel d'agent pathogène. Elle sera prochainement appliquée au criblage à haut débit des agents infectieux présent dans des tiques collectées à travers la Caraïbe, provenant notamment de Trinité-et-Tobago, Saint-Kitts, la Barbade, et Sainte-Lucie, grâce à la collaboration du réseau CaribVet, et de vétérinaires locaux.

**Mots clés :** Tique, Agents pathogènes, Épidémiologie, PCR microfluidique en temps réel, Caraïbes.

## **New pathogens and microorganisms discovery in Caribbean ticks by next generation sequencing and microfluidic real-time PCR.**

Vector-borne diseases are illnesses caused by pathogens transmitted by haematophagous arthropods which provide active transmission (mechanical or biological) of infectious agents from one vertebrate to another. Among these vectors, ticks are known to carry and transmit the greatest variety of pathogens of public health and veterinary importance. They transmit microorganisms responsible for bacterial (Lyme borreliosis, rickettsioses), parasitic (babesiosis, theileriosis), or viral diseases (tick-borne encephalitis).

The Antilles are located in the heart of the Caribbean Neotropical Zone. This area can be considered at risk for the emergence of vector-borne diseases mainly due to favorable environmental conditions and intercontinental exchanges (e.g. legal and illegal animal trade, migratory birds). However, the epidemiological situation of the Caribbean area, with regard to tick-borne diseases, is still poorly documented. Indeed, most of field studies only focused on animal pathogens such as *Ehrlichia ruminantium*, *Babesia* (*bovis* and *bigemina*) and *Anaplasma marginale* and questions about the risk of emergence or re-emergence of tick-borne diseases remain unanswered. Thus, it is crucial to develop efficient epidemiological surveillance tools that would enable the detection of new, known or unexpected pathogens present in ticks. In this context, the main objective of my thesis was to obtain an overview of pathogens of medical and veterinary interest present in Caribbean ticks using new high-throughput technologies.

We first used a high-throughput sequencing approach to determine pathogens present in ticks (bacteria, parasites, and viruses) collected in Guadeloupe and Martinique. This analysis revealed a great diversity of pathogenic agents in our samples and highlighted the presence of four viruses belonging to new viral families recently described and associated with arthropods.

Results of sequencing combined with data available in the literature allowed us to make the most exhaustive list of pathogens potentially transmitted by ticks and requiring health surveillance in the Caribbean area. From this pathogen inventory, we developed a system of high-throughput screening of infectious agents applicable to the whole Caribbean area. This molecular tool is a microfluidic system based on the Biomark™ dynamic arrays technology (Fluidigm Corporation), which enables high-throughput real-time PCR to simultaneously detect 48-96 targets within 48 to 96 samples. Two different chips have been developed, one for bacteria and parasites monitoring, and one for viruses. Their efficiency was tested on tick samples collected in both Guadeloupe and Martinique. This large-scale screening provided a comprehensive overview of the epidemiological situation of 45 bacteria, 17 parasites and 31 viruses potentially transmitted by ticks in the French West Indies.

The high-throughput detection tool developed during my thesis represents a major improvement in epidemiological surveillance technology, enabling the rapid and concomitant monitoring of a wide range of pathogens. It will soon be applied to high-throughput screening of infectious agents found in ticks collected throughout the Caribbean, including Trinidad and Tobago, St. Kitts, Barbados, and St. Lucia, thanks to the collaboration with the CaribVet network, and local veterinarians.

**Keywords :** Tick, Pathogens, Epidemiology, microfluidic real-time PCR, Caribbean.